



**Leonel Augusto
Teixeira Lopes**

**Efeitos terapêuticos de *Inula crithmoides* em
ratinhos expostos ao CCl₄**



**Leonel Augusto
Teixeira Lopes**

**Efeitos terapêuticos de *Inula crithmoides* em
ratinhos expostos ao CCl₄**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e Doutora Helena Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e à minha namorada pelo amor, carinho e apoio recebido ao longo da realização deste trabalho.

o júri

presidente

Professor Doutor António José Arsénia Nogueira
Professor Associado com Agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente principal

Professora Doutora Virgília Sofia Almeida de Azevedo e Silva
Investigadora em Pós-Doutoramento, CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar,
Universidade de Aveiro

vogal

Professora Doutora Ana Maria Loureiro da Seca
Professora Auxiliar Convidada, Secção Autónoma de Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro

orientadora

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

co-orientadora

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva
Professora Auxiliar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, minha orientadora, por me ter dado a oportunidade de realizar a tese numa área que sempre me interessou e por todo o apoio que me deu ao longo da realização deste trabalho. Estou especialmente grato pela sua ajuda científica, disponibilidade para esclarecer dúvidas e acima de tudo pela sua amizade.

Agradeço à Professora Doutora Helena Silva, minha co-orientadora, pela ajuda científica na área da botânica, pela prontidão em resolver problemas relacionados com o trabalho e pelo bom relacionamento.

À Professora Doutora Ana Seca, agradeço a ajuda científica na área da Química dos Produtos Naturais e das técnicas espectroscópicas. Eu, particularmente reconheço a sua prontidão e interesse em resolver problemas que surgiram ao longo da realização deste trabalho.

Aos Professores Doutores Artur Silva e Diana Pinto da Unidade de Química Orgânica Produtos Naturais e Agroalimentares, agradeço a oportunidade de realizar estudos fitoquímicos e as facilidades concedidas na realização deste trabalho.

À Sónia Oliveira, Catarina Ferreira e especialmente à Cátia Santos, meus colegas de laboratório, agradeço a ajuda e cooperação na realização deste trabalho.

palavras-chave

Inula crithmoides; CCl₄; histologia; hepatoprotecção; hepatoregeneração; fitoquímica; lactonas sesquiterpénicas; flavonóides; ácido cinâmico; dissacarídeo.

resumo

A actividade regeneradora e protectora do extracto aquoso de porções aéreas de *Inula crithmoides* L. foi avaliada em ratinhos expostos ao CCl₄. O fígado, rim e baço foram analisados histologicamente para verificar estas actividades. Os dados histológicos mostraram que o extracto aquoso não apresentou toxicidade na dose de 250 mg/Kg e que possuía um efeito hepatoregenerador nas doses administradas (250 mg/Kg e 500 mg/Kg). Outro objectivo do presente estudo, consistiu em avaliar a actividade regeneradora das fracções de acetona, etanol, etanol:água (50:50) e resíduo do extracto aquoso de *I. crithmoides*. Posteriormente, foram isolados por cromatografia em coluna e caracterizados por análise espectroscópica, os constituintes químicos da fracção que apresentou um maior efeito regenerador. Os dados histológicos revelaram que a fracção de etanol:água (50:50) (250 mg/Kg) foi a que apresentou uma maior actividade regeneradora, principalmente no fígado. Os compostos isolados foram o ácido 3,4-diacetoxi-cinâmico (**1**) e o dissacarídeo 4-O-[6'-(1',2',3',4'-tetra-O-acetil)frutofuranosil]-1,2,3,6-tetra-O-acetilfrutofuranose-D (**2**). Os resultados obtidos sugerem que o extracto aquoso não revelou um efeito protector. Apresentou um efeito hepatoregenerador e a fracção de etanol:água (50:50) foi a que revelou uma maior actividade regeneradora. A realização do presente estudo, leva-nos a concluir que é importante aprofundar o conhecimento das propriedades terapêuticas de *I. crithmoides*, com vista à sua futura aplicação, e realizar estudos de isolamento e caracterização dos seus princípios activos.

keywords

Inula crithmoides; CCl₄; histology; hepatoprotective effect; hepatoregenerative effect; phytochemistry; sesquiterpene lactones; flavonoids; cinnamic acid; disaccharide.

abstract

The regenerative and protective activity of aqueous extract of aerial parts of *Inula crithmoides* L. was evaluated in mice exposed to CCl₄. The liver, kidney and spleen were histologically analyzed to verify these activities. Histological analysis revealed that the aqueous extract was not toxic at a dose of 250 mg/kg and revealed hepatoregenerative effects in the dosage administered (250 mg/kg and 500 mg/Kg). Another aim of this study, was to evaluate the regenerative activity of the fractions of acetone, ethanol, ethanol:water (50:50) and residue of aqueous extract of *I. Crithmoides*. Were isolated by column chromatography and characterized by spectroscopic analysis the chemical constituents of the fraction showed a greater regenerative effect. The histological data revealed that the fraction of ethanol:water (50:50) (250 mg/Kg) showed the greater regenerative activity, mainly in the liver. The compounds isolated were 3,4-diacetoxycinnamic acid (**1**) and 4-O-[6'-(1',2',3',4'-tetra-O-acetyl)fructofuranosyl]-1,2,3,6-tetra-O-acetylfructofuranose - D (**2**). The results obtained suggest that the aqueous extract didn't show a protective effect. However, a hepatoregenerative effect is suggested, and the fraction of ethanol:water (50:50) showed greater regenerative activity. This study, leads us to conclude that it is important to better understand the knowledge of the therapeutic properties of *I. crithmoides* for future use and, perform studies of isolation and characterization of its active principles.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	8
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas.....	11
Abreviaturas	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Importância das plantas medicinais	14
1.2 Propriedades farmacológicas de espécies do género <i>Inula</i> e das classes de compostos típicos deste género.....	15
1.3 Tetracloreto de carbono (CCl ₄).....	20
1.4 Órgãos em estudo: vulnerabilidade a lesões provocados por químicos.....	21
1.4.1 Fígado	21
1.4.2 Rim	22
1.4.3 Baço.....	23
2. OBJECTIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Tratamentos	26
3.3 Ensaio histopatológico.....	26
3.4 Análise estatística	27
3.5 Avaliação do efeito protector e regenerador do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i>	27
3.5.1 Colheita dos espécimes vegetais e preparação do extracto aquoso	27
3.5.2 Grupos experimentais	27
3.6 Avaliação do efeito regenerador de quatro fracções do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i>	28
3.6.1 Preparação das fracções a partir do extracto aquoso	28
3.6.2 Grupos experimentais	29
3.7 Isolamento e identificação dos compostos químicos da fracção de etanol:água (50:50).....	29
3.7.1 Solventes utilizados	29

3.7.2	Tipo de sílica usada nas cromatografias	29
3.7.3	Equipamento usado	30
3.7.4	Estudo fitoquímico da fracção etanol:água (50:50) obtida a partir do extracto aquoso das porções aéreas de <i>I. crithmoides</i>	30
3.7.4.1	Acetilação da fracção em estudo.....	30
3.7.4.2	Fraccionamento cromatográfico	31
3.7.5	Dados espectroscópicos dos compostos isolados da fracção acetilada de <i>Inula crithmoides</i>	31
4.	RESULTADOS	34
4.1	Avaliação do efeito protector e regenerador do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i>	34
4.1.1	Comportamento dos animais ao longo da experiência	34
4.1.2	Efeito no peso corporal e peso relativo dos órgãos	34
4.1.3	Observação macroscópica dos órgãos	36
4.1.4	Análise histológica	36
4.1.4.1	Fígado	36
4.1.4.2	Rim.....	38
4.1.4.3	Baço	40
4.2	Avaliação do efeito regenerador de quatro fracções do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i>	42
4.2.1	Comportamento dos animais ao longo da experiência	42
4.2.2	Efeito no peso corporal e peso relativo dos órgãos	42
4.2.3	Observação macroscópica dos órgãos	44
4.2.4	Análise histológica	44
4.2.4.1	Fígado	44
4.2.4.2	Rim.....	46
4.2.4.3	Baço	48
4.3	Caracterização estrutural dos compostos isolados a partir da fracção acetilada de <i>I. crithmoides</i>	50
5.	DISCUSSÃO.....	62
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

Índice de Figuras

Figura 1: Estruturas gerais de, a) lactonas sesquiterpénicas e b) flavonóides.	18
Figura 2: Principal modo de acção proposto para o CCl ₄	21
Figura 3: Efeitos do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i> (IC) na toxicidade induzida pelo CCl ₄ no fígado de ratinhos	37
Figura 4: Efeitos do extracto aquoso do <i>Inula crithmoides</i> (IC) na toxicidade induzida pelo CCl ₄ nos rins de ratinhos	39
Figura 5: Efeitos do extracto aquoso <i>Inula crithmoides</i> (IC) na toxicidade induzida pelo CCl ₄ no baço de ratinhos	41
Figura 6: Efeitos das fracções do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i> (IC) na toxicidade induzida pelo CCl ₄ no fígado de ratinhos	45
Figura 7: Efeitos das fracções do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i> (IC) na toxicidade induzida pelo CCl ₄ nos rins de ratinhos	47
Figura 8: Efeitos das fracções do extracto aquoso de <i>Inula crithmoides</i> (IC) na toxicidade induzida pelo CCl ₄ no baço de ratinhos.....	49
Figura 9: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H do composto 1	51
Figura 10: Espectro de RMN ¹³ C do composto 1	52
Figura 11: Ampliação do espectro de HSQC do composto 1	53
Figura 12: Conectividades ¹ H- ¹³ C observadas no espectro de HMBC do composto 1	54
Figura 13: Espectro de massa do composto 1	54
Figura 14: Conectividades exibidas pelo espectro de HMBC do composto 1	55
Figura 15: Ampliação do espectro de RMN ¹ H do composto 2	57
Figura 16: Espectros de RMN ¹³ C (a) e DEPT (b) do composto 2	58
Figura 17: Conectividades ¹ H- ¹³ C observadas no espectro de HMBC do composto 2	59

Índice de Tabelas

Tabela I: Evolução do peso corporal dos ratinhos ao longo da experiência nos diferentes grupos	35
Tabela II: Peso relativo dos órgãos nos diferentes grupos	35
Tabela III: Evolução do peso corporal dos ratinhos ao longo da experiência nos diferentes grupos	43
Tabela IV: Peso relativo dos órgãos nos diferentes grupos.....	43
Tabela V: Algumas correlações observadas no espectro de HSQC do composto 1	52

Abreviaturas

δ : Desvio químico em relação ao tetrametilsilano

AcOEt: Acetato de etilo

cc: Cromatografia em coluna

$\text{CCl}_3\cdot$: Radical triclorometilo

CCl_4 : Tetracloreto de carbono

$\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$: Radical triclorometilperoxilo

CHCl_3 : Clorofórmio

CH_3OH : Metanol

COSY: Espectro bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear em RMN

d: Dupleto

dd: Duplo dupleto

DEPT: “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”

EM: Espectrometria de massa

Et_2O : Éter dietílico

H: Hidrogénio

H&E: Hematoxilina e Eosina

HMBC: Espectro bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância em RMN

HSQC: Espectro bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear a uma ligação em RMN

IC: *Inula crithmoides*

J : Constante de acoplamento (Hz)

$[\text{M}]^+$: Ião molecular (espectrometria de massa)

m: Multiplete

MeOH: Metanol

m/z : Relação massa carga (em espectrometria de massa)

NaCl: Cloreto de sódio

-OH: Grupo hidroxilo

ppm: Parte por milhão

RMN ^{13}C : Ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ^1H : Ressonância magnética nuclear de próton

s: Singuleto

t: Tripleto

TLC: Cromatografia em camada fina

TMS: Tetrametilsilano

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância das plantas medicinais

As plantas medicinais desempenham um papel fundamental na saúde humana. A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana e, por um longo período de tempo, produtos de origem mineral, animal e vegetal foram as principais fontes de medicamentos (Rates, 2001). Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os medicamentos em uso clínico no mundo. As plantas vasculares contribuem com pelo menos 25 % do total (Gurib-Fakim, 2006).

A fitoterapia é utilizada principalmente nos países em vias de desenvolvimento para os cuidados de saúde primários, devido a uma melhor aceitabilidade cultural, melhor compatibilidade com o corpo humano e a um menor número de efeitos secundários (Kamboj, 2000).

Os efeitos terapêuticos das plantas medicinais estão associados às suas propriedades químicas. Distinguem-se das outras plantas, dado que têm a capacidade para sintetizar e acumular substâncias naturais fisiologicamente activas, com assinaláveis actividades fisiológicas. Alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos, glicosídeos e polissacarídeos são de particular interesse no que diz respeito aos seus efeitos terapêuticos (Lovkova *et al.*, 2001).

As substâncias sintetizadas pelas plantas medicinais podem actuar individualmente, aditivamente ou em sinergia. Uma única planta pode, por exemplo, conter substâncias amargas (lactonas sesquiterpénicas) que estimulam a digestão, compostos anti-inflamatórios que reduzem o inchaço e a dor, compostos fenólicos que podem actuar como antioxidantes, venotónicos, anti-bacterianos e anti-fúngicos, substâncias diuréticas que aumentam a eliminação de produtos de excreção e toxinas, e alcalóides que contribuem para o bem-estar (Gurib-Fakim, 2006).

As plantas medicinais são usadas para o tratamento e prevenção de diversas doenças humanas, incluindo as cardiovasculares, gastrointestinais, doenças da pele e do sistema nervoso, e até mesmo doenças malignas (Lovkova *et al.*, 2001).

A maioria dos compostos bioactivos com utilidade e interesse medicinal tendem a ser metabolitos secundários (Gurib-Fakim, 2006). Além disso, a grande diversidade molecular dos metabolitos secundários em todo o reino vegetal representa um recurso biogénico extremamente rico, que serve de fonte para o desenho, síntese e avaliação de fármacos inovadores (Balunas & Kinghorn, 2005; Gurib-Fakim, 2006). Neste domínio, a investigação em farmacologia de compostos naturais activos, depende da integração das ciências básicas como a botânica, química e a farmacologia, incluindo a toxicologia (Rates, 2001).

Ainda que as plantas medicinais sejam eficazes no tratamento de várias doenças, muitas vezes são pouco exploradas cientificamente e/ou utilizadas indevidamente. Assim, essas plantas medicinais merecem estudos detalhados à luz da ciência moderna (Subramoniam & Pushpangadan, 1999).

1.2 Propriedades farmacológicas de espécies do género *Inula* e das classes de compostos típicos deste género

Inula crithmoides L. é uma erva perene da família Compositae (Asteraceae), com distribuição na Ásia, Europa, África e predominantemente no Mediterrâneo (Zhao *et al.*, 2006). Em Portugal encontra-se em solos arenosos e salgadiços do litoral centro e sul, e também em fendas de rochas costeiras (Franco, 1984)

Recentemente, muita atenção tem sido dada ao género *Inula*, que compreende cerca de 100 espécies, devido à extensa lista de aplicações etnofarmacológicas de diversas espécies deste género, como por exemplo, bactericida, hepatoprotectora e antitumoral (Zhao *et al.*, 2006). Outro exemplo, é a utilização dos ramos floridos de várias espécies de *Inula* na medicina tradicional, para o tratamento de bronquite, tuberculose, anemia, malária e para doenças do sistema urinário (Boulos *in* Abdel-Wahhab *et al.*, 2008).

As raízes e flores de *Inula helenium* L., são referidas num artigo de revisão de 2010 (Ram *et al.*), como tendo aplicação no tratamento de enfisema, bronquite e bronquite asmática, enquanto noutro trabalho é indicada a sua aplicação no tratamento de psoríase (Menkovic *et al.*, 2010). Na Bósnia-Herzegovina, o chá desta planta é usado para promover a regulação do período menstrual (Saric-Kundalic *et al.*, 2010). É referido também num artigo de revisão de 2006 (Zhao *et al.*), que a *I. helenium* possui propriedades

antitússicas, expectorantes e diaforéticas. O'Shea e seus colaboradores (2009) verificaram que esta espécie possui uma actividade bactericida, *in vitro*, nomeadamente contra a estirpe *Staphylococcus aureus*.

As lactonas sesquiterpénicas (fig. 1a) são uma classe de compostos característicos do género *Inula* (Bai *et al.*, 2006). Estas substâncias são conhecidas por exibirem actividades biológicas tais como antitumoral (Rodriguez *et al.*, 1976; Picman, 1986; Lee *et al.*, 2001), antimicrobiana (Rodriguez *et al.*, 1976; Picman, 1986; Fischer *et al.*, 1998), anti-inflamatória (Lyss *et al.*, 1998), mutagénica, genotóxica e citotóxica (Rodriguez *et al.*, 1976; Picman, 1986).

Na *I. helenium*, algumas das lactonas sesquiterpénicas isoladas foram a alantolactona, 5 α -epoxialantolactona (Konishi *et al.*, 2002; Huo *et al.*, 2010); isoalantolactona, igalano e também dois isómeros designados por, aloalantolactona e dugesialactona (Huo *et al.*, 2010). A alantolactona e a 5 α -epoxialantolactona, isoladas desta espécie, mostraram possuir uma acção antiproliferativa *in vitro* contra células tumorais (Konishi *et al.*, 2002). Noutro trabalho, Zhao e seus colaboradores (2010) isolaram das raízes de *I. helenium* as lactonas, 1 α -hidroxi-11,13-di-hidroisoalantolactona, 3 α -hidroxi-11,13-di-hidroalantolactona e um outro composto designado por, macrophylilactona E.

Os polissacáridos, nomeadamente a inulina, são outra classe de compostos encontrados no género *Inula* que exibem diversas actividades biológicas. Por exemplo, a acção diurética de *I. helenium* deve-se à presença de uma grande quantidade de inulina nesta espécie (Proença da Cunha *et al.*, 2006). A inulina apresenta outras actividades, tais como, estimulação do crescimento de bifidobactérias, pois a inulina é um prebiótico; inibição do crescimento do cancro do cólon e da mama em modelos animais (Reddy *et al.*, 1997; Roberfroid *et al.*, 1998; Reddy, 1999); efeito hipocolesterolémico e hipoglicémico (Causey *et al.*, 2000; Proença da Cunha *et al.*, 2006); redução dos níveis de ureia plasmática (Proença da Cunha *et al.*, 2006); prevenção e redução da colite ulcerosa (Okayasu *et al.*, 1990; Videla *et al.*, 2001). Bell & Palmer (1952) isolaram e caracterizaram estruturalmente a inulina de *I. helenium*, tendo concluído que se trata de um polímero polidisperso maioritariamente de frutose.

A inulina foi também isolada e caracterizada estruturalmente em *Inula grandis* Schrenk (Khodzhaeva & Kondratenko, 1982). Desta espécie foram também isoladas

diversas lactonas sesquiterpénicas, como a grandulina, grandicina (Nikonova & Nikonov, 1970), granilina (Nikonova & Nikonov, 1972), igalino, igalol e grandol (Nikonova & Nikonov, 1971). Em *I. grandis*, foi também isolado o flavonóide 4,5,6-tri-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona (Nikonova & Nikonov, 1975) e diversos ácidos orgânicos, tais como, o ácido fumárico, ácido acético, ácido butírico, ácido propanóico e o ácido cinâmico (Nikonova & Gusakova, 1972).

Inula britannica L., uma das espécies mais estudadas, é descrita como tendo aplicação no tratamento de bronquite, em problemas digestivos (Bai *et al.*, 2006) e inflamatórios (Liu *et al.*, 2007). As flores desta espécie são usadas no tratamento de infecções bacterianas e virais (incluindo hepatite), assim como em tumores, como refere o artigo de revisão de 2006 (Zhao *et al.*). Iijima e seus colaboradores (1995) verificaram que o acetato de taraxasterilo, um composto da família dos triterpenos, isolado do extracto de clorofórmio (CHCl_3) de *I. britannica*, previne hepatites causadas por *Propionibacterium acnes* e lipossacarídeos em ratos, sendo este efeito hepatoprotector verificado também pelo extracto aquoso desta espécie (Song *et al.*, 2000). Algumas das lactonas sesquiterpénicas isoladas de *I. britannica*, como a neobritanilactona B e a acetil neobritanilactona B, demonstraram possuir moderada actividade citotóxica e apoptótica em células cancerígenas humanas (Bai *et al.*, 2006). A 1-*O*-acetilbritanilactona (ABL), uma lactona sesquiterpénica extraída de *I. britannica*, revelou ter uma acção anti-inflamatória muito forte, estando o seu mecanismo de acção a ser estudado e é um forte candidato a estudos clínicos (Han *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007).

Os flavonóides (fig. 1b), outra família típica do género *Inula* (Abdel-Wahhab *et al.*, 2008), são descritos na literatura como possuindo diversas actividades, tais como, antioxidantes (Pietta, 2000; Havsteen, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1996), vasodilatadoras, anticarcinogénicas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antialérgicas, antivirais, entre outras (Rice-Evans *et al.*, 1996). Os flavonóides, nepetina, patuletina e axilarina, isolados das flores de *I. britannica*, demonstraram ter capacidade de proteger culturas primárias de células corticais do rato do stress oxidativo induzido pelo glutamato (Kim *et al.*, 2002).

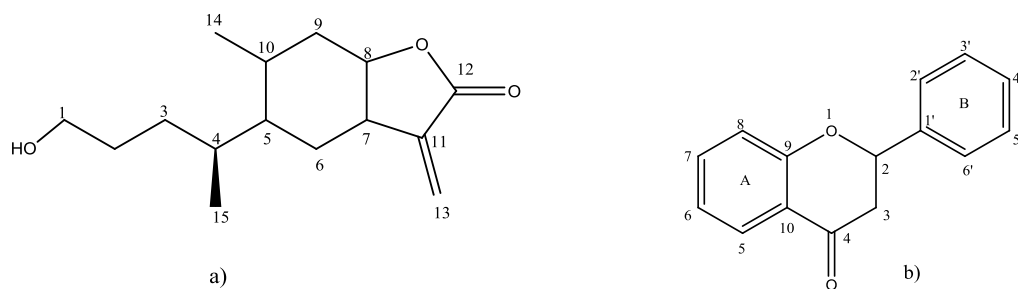


Figura 1: Estruturas gerais de, a) lactonas sesquiterpénicas e b) flavonóides.

O extracto aquoso de *Inula crithmoides* L., mostrou ser capaz de neutralizar o stress oxidativo e ter um efeito protector contra a citotoxicidade induzida pela ochratoxina A (Abdel-Wahhab *et al.*, 2008). Santos (2009), verificou que o extracto aquoso de *I. crithmoides*, possui um efeito hepatoregenerador em ratinhos na toxicidade induzida pelo CCl₄. Barrachina e seus colaboradores (1995), demonstraram que o extracto de diclorometano desta espécie, possui diversas actividades farmacológicas, entre as quais, diminuição da pressão sanguínea, efeitos analgésicos e anti-inflamatórios. No óleo essencial de *I. crithmoides*, os componentes identificados, *p*-cimeno, 1-metiletil-trimetilbenzeno, escopoletina e α -pineno, mostraram exercer uma actividade antioxidante, impedindo a peroxidação lipídica (Giamperi *et al.*, 2010).

Estudos fitoquímicos já realizados, permitiram isolar de *I. crithmoides* diversos monoterpenos derivados do timol (Metwally & Dawidar, 1985; Marco *et al.*, 1993), tendo inclusivamente sido desta espécie que se isolaram os primeiros derivados clorados (Marco *et al.*, 1993). A cirsimarina, neptina, inucritmina, quercetagetina e isoramnetina, compostos da família dos flavonóides, foram também isolados de *I. crithmoides* (El-Lakany *et al.*, 1996; Selim in Abdel-Wahhab *et al.*, 2008). Mahmoud e seus colaboradores (1981) isolaram das porções aéreas desta espécie, um derivado do caroteno e um eudesmanolido, sendo este último designado por, inucritmolido. Kacem e seus colaboradores (2008) extraíram de *I. crithmoides*, polissacáridos, nomeadamente pectinas.

O extracto de éter de petróleo das folhas de *Inula viscosa* (L.) Aiton, mostrou exibir actividade antifúngica através da diminuição da síntese de quitina em dermatófitos e em *Candida albicans* (Maoz & Neeman, 2000), e acção inibidora contra fungos fitopatogénicos (Abou-Jawdah *et al.*, 2002). Outros estudos, referiram que o extracto aquoso de *I. viscosa* mostrou possuir uma actividade hipoglicémica em ratos saudáveis e

diabéticos (Zeggwagh *et al.*, 2006), e um efeito anti-implantacional, abortivo a médio prazo e luteolítico em ratos fêmeas grávidas (Al-Dissi *et al.*, 2001). Das porções aéreas de *I. viscosa* foram isoladas as flavonas nepetina, apigenina e hispidulina; os flavonóis ramnocitrina, isoramnetina, axilarina, espinacetina e ramnazina; e as flavononas sakuranetina e eriodictiol (Wollenweber *et al.*, 1991).

A fracção de *n*-hexano do extracto de etanol (95%) de *Inula racemosa* Hook. f., possui citotoxicidade, *in vitro*, contra linhas celulares tumorais humanas (Pal *et al.*, 2010). Srivastava e seus colaboradores (1999) verificaram em ratos, que o extracto etanólico da raiz de *I. racemosa* possui potentes propriedades antialérgicas. Do extracto de MeOH-Et₂O-éter de petróleo das raízes desta espécie, foram isolados o β -sitosterol, daucosterol (esteróis vegetais) e uma grande quantidade de isoalantolactona (lactona sesquiterpénica) (Tan *et al.*, 1998). A isoalantolactona inibe o crescimento de fungos patogénicos para os humanos (*Aspergillus flavus*, *A.niger*, *Geotrichum candidum*, *Candida tropicalis* e *C. albicans*) (Tan *et al.*, 1998) e demonstrou possuir uma actividade insecticida contra o gorgulho do arroz *Sitophilus oryzae* (Liu *et al.*, 2006). Além da isoalantolactona, Lokhande e seus colaboradores (2007) isolaram mais duas lactonas sesquiterpénicas das raízes de *I. racemosa*, a alantolactona e a di-hidroalantolactona, e verificaram que todas elas possuem actividade antibacteriana. As lactonas sesquiterpénicas alantodiene e isoalantodiene, isoladas de *I. racemosa*, apresentam como actividade biológica a regulação do crescimento de plantas (Kalsi *et al.*, 1989). Esta actividade biológica foi também exibida pelo isoinunal, outro composto isolado das raízes desta espécie (Kalsi *et al.*, 1988). Goyal e seus colaboradores (1990) isolaram três alantolidos oxigenados de *I. racemosa*.

O óleo essencial de *Inula graveolens* (L.) Jacq., revelou possuir actividade bactericida contra a estirpe *Staphylococcus aureus* (Guinoiseau *et al.*, 2010). Os óleos essenciais desta espécie são utilizados no tratamento de bronquites, laringites e sinusites, favorecem a circulação linfática bem como o sistema imunitário (Harzallah-Skhiri *et al.*, 2005). Dos óleos essenciais de *I. graveolens* foram identificados como constituintes maioritários o canfeno, o carvone e o β -selineno (Harzallah-Skhiri *et al.*, 2005), o acetato de bornilo, o borneol e o τ -cadinol (Blanc *et al.*, 2004; Harzallah-Skhiri *et al.*, 2005), todos eles compostos da família dos terpenos. Lactonas sesquiterpénicas isoladas de *I. graveolens* demonstraram possuir actividade citotóxica (Topçu, 1993).

1.3 Tetracloreto de carbono (CCl₄)

O tetracloreto de carbono (CCl₄) foi no passado extensivamente usado como solvente, agente de limpeza, extintor de incêndio, intermediário sintético, fumigante e vermífugo para os seres humanos. O seu uso tem decaído desde 1970, devido à sua toxicidade hepatorenal, carcinogenicidade e contribuição para a diminuição da camada do ozono (ATSDR, 2005).

O CCl₄ é conhecido como um modelo tóxico e tem sido foco de muitos estudos toxicológicos *in vivo* e *in vitro*. O principal alvo de toxicidade e carcinogénese é o fígado, tendo como resultado degenerescência gorda, necrose celular, fibrose e cirrose (Manibusan *et al.*, 2007). Porém, outros estudos demonstraram que o CCl₄ também é tóxico para os rins (Ozturk *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010), testículos e pulmões (Abraham *et al.*, 1999).

A lesão renal e hepática pode ocorrer a partir de uma única exposição aguda, mas é mais provável após exposições repetidas. Quanto mais baixo o nível de exposição, maior é a probabilidade da lesão ocorrer predominantemente no fígado (Williams *et al.*, 2000).

O CCl₄ é um exemplo clássico de um químico activado pelo citocromo P450 para formar um radical altamente reactivo (fig. 2) (Hodgson, 2004). Os eventos chave envolvidos na carcinogenicidade provocada pelo CCl₄ são: i) conversão do CCl₄ no radical triclorometilo (CCl₃·) pelo CYP2E1 e subsequente formação do radical triclorometilperoxilo (CCl₃O₂·); ii) peroxidação lipídica autocatalítica devido ao ataque à membrana celular pelo radical triclorometilperoxilo; iii) perda da homeostase do cálcio levando à activação de enzimas de degradação e citotoxicidade; e iv) mudanças regenerativas e proliferativas constantes no fígado em resposta à hepatotoxicidade (Fig. 2) (Manibusan *et al.*, 2007).

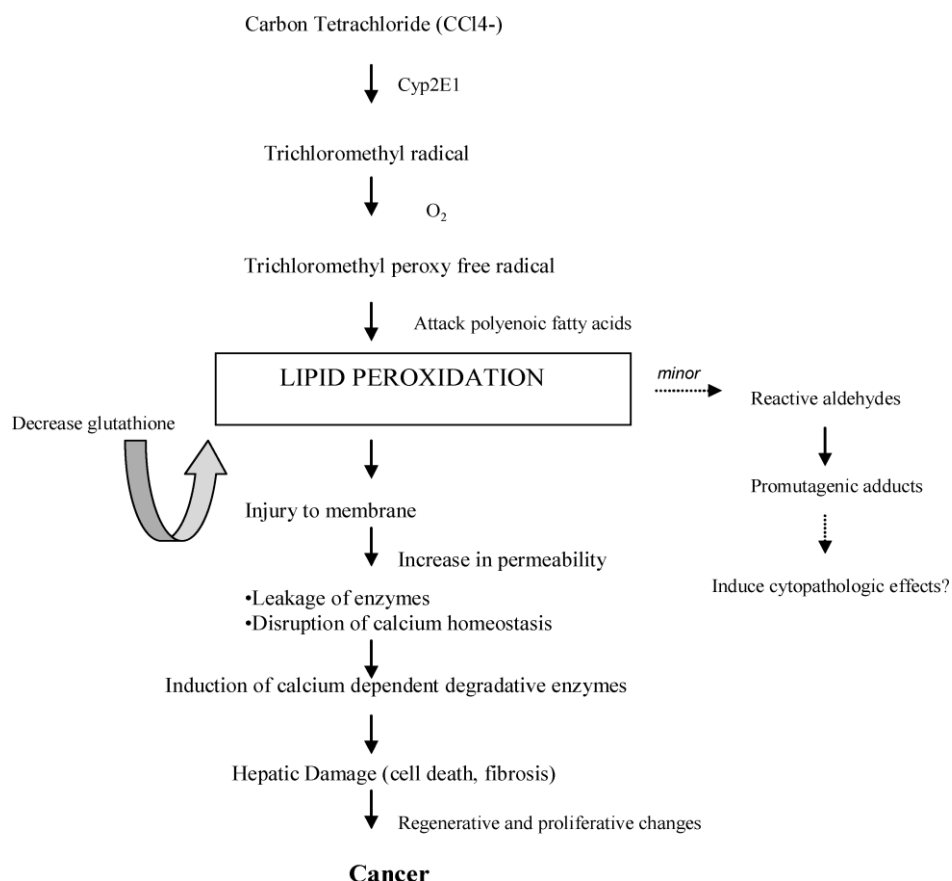


Figura 2: Principal modo de acção proposto para o CCl₄. (Extraído de Manibusan *et al.*, 2007).

Os produtos do metabolismo do CCl₄ (CCl₃· e CCl₃O₂·) são radicais muito reactivos e geralmente têm um pequeno raio de acção. Por esta razão a necrose induzida pelo CCl₄ é mais grave nas células hepáticas centrolobulares, que contém uma maior concentração da isoenzima P450 responsável pela activação do CCl₄ (Hodgson, 2004).

1.4 Órgãos em estudo: vulnerabilidade a lesões provocados por químicos

1.4.1 Fígado

O fígado é formado por células hepáticas (hepatócitos ou células do parênquima) e capilares sanguíneos especializados, designados de sinusóides (Hodgson, 2004). Os hepatócitos apresentam três funções principais: (1) síntese, (2) armazenamento, e (3)

biotransformação. Além destas funções, o fígado realiza ainda funções de fagocitose (células de Küpffer) e de desintoxicação (Seeley *et al.*, 1995).

A localização anatómica, assim como o seu papel na biotransformação, fazem do fígado um órgão susceptível a lesões induzidas por diversos agentes químicos (Williams *et al.*, 2000). Alguns dos xenobióticos entram no organismo através do tracto gastro-intestinal e, após a absorção, são transportados pela veia porta hepática até ao fígado, induzindo diversas lesões neste órgão. Um segundo factor, é a alta concentração de enzimas capazes de metabolizar xenobióticos, principalmente o sistema de monooxigenases dependentes do citocromo P450 (Haschek & Rousseaux, 1998; Hodgson, 2004). Embora a maior parte das biotransformações sejam reacções de desintoxicação, muitas reacções oxidativas produzem metabolitos reactivos que podem induzir lesões hepáticas (Hodgson, 2004). Estas incluem, degenerescência e necrose, esteatose, colestase, lesão vascular, cirrose e desenvolvimento de tumor (Williams *et al.*, 2000).

A avaliação histopatológica pode fornecer informações acerca da natureza da lesão e as regiões do fígado afectadas. Por exemplo, a presença de esteatose sugere que o químico pode interferir com o metabolismo de triglicéridos e/ou secreção de lipoproteínas pelo fígado. Necrose hepatocelular limitada à região centrolobular, pode sugerir a bioactivação do produto químico pelo citocromo P450, uma vez que a maioria da actividade desta enzima existe nas células centrolobulares (Williams *et al.*, 2000).

O fígado possui uma extraordinária capacidade de regeneração. A perda de tecido hepático através da remoção cirúrgica ou da acção de substâncias tóxicas, desencadeia um mecanismo pelo qual os hepatócitos se dividem, continuando até que a massa original do tecido seja regenerada (Junqueira & Carneiro, 2005).

1.4.2 Rim

A unidade funcional do rim é o nefrónio. Os rins possuem três funções essenciais: 1) funcionam como filtros, removem produtos metabólicos e toxinas do sangue excretando-os através da urina; 2) desempenham um papel chave na homeostasia por regulação do estado do fluido corporal, do equilíbrio electrolítico e do equilíbrio ácido – base; 3) produzem hormonas envolvidas na eritropoiese, no metabolismo do cálcio e na regulação da pressão sanguínea e fluxo sanguíneo (Boron & Boulpaep, 2005).

Diversos factores estão envolvidos na sensibilidade do rim a uma série de substâncias tóxicas. Embora os rins correspondam a menos de um 1% do peso corporal, recebem cerca de 25 % do fluxo sanguíneo. Assim, quantidades significativas de substâncias químicas exógenas e/ou os seus metabolitos são libertadas nos rins. Os factores que afectam a sensibilidade dos rins aos tóxicos são: a capacidade para concentrar o líquido tubular que este órgão possui, dado que a água e sais minerais são removidos, concentrando todos os produtos químicos que ele contém, e a biotransformação de substâncias químicas reactivas, e portanto, potencialmente tóxicos. Algumas regiões dos rins têm níveis consideráveis de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, particularmente o citocromo P450 presente no túbulo proximal, uma região particularmente susceptível a lesões provocadas por químicos (Hodgson, 2004), embora sejam observadas lesões noutras regiões do nefrónio (Williams *et al.*, 2000)

Os elevados níveis de glutathione no rim, desempenham um papel importante na protecção e no processo de desintoxicação deste órgão (Hodgson, 2004). Outros meios de protecção dos rins contra lesões, incluem a indução de metalotioneínas e proteínas de choque térmico. Estas desempenham um papel de vigilância, mantendo a estrutura normal de proteínas e/ou eliminando proteínas danificadas (Williams *et al.*, 2000).

1.4.3 Baço

O baço fornece um local para a proliferação de linfócitos, de resposta e vigilância imunológica. Os macrófagos removem detritos, substâncias estranhas, bactérias, vírus e toxinas do sangue que flui através dos seus vasos. O baço também realiza outras funções: 1) armazena alguns produtos de degradação das hemácias para mais tarde os reutilizar e liberta outros produtos no sangue para serem processados pelo fígado; 2) é um local de produção de eritrócitos do feto (capacidade que normalmente cessa após o nascimento); 3) armazena plaquetas sanguíneas (Marieb, 2001).

A interacção de substâncias tóxicas com o sistema imunológico pode resultar em três tipos principais de efeitos adversos: aqueles que se manifestam como uma reacção de hipersensibilidade (1), imunossupressão (2) ou auto-imunidade (3) (Williams *et al.*, 2000).

A natureza dinâmica do sistema imunitário fornece-lhe uma grande capacidade regenerativa. Assim, após a exposição a xenobióticos que destroem o sistema imunológico,

a regeneração ocorre num tempo relativamente curto, podendo a anatomia original do sistema imunológico ser restaurada ao fim 3-4 semanas (Haschek & Rousseaux, 1998).

2. OBJECTIVOS

O presente trabalho teve dois objectivos principais. O primeiro foi avaliar o potencial efeito hepatoprotector e hepatoregenerador do extracto aquoso de *Inula crithmoides* (IC) em ratinhos injectados com tetracloreto de carbono (CCl₄), recorrendo a estudos histológicos. Avaliou-se também os possíveis efeitos regeneradores e protectores do extracto aquoso de *I. crithmoides* noutros órgãos, tais como, baço e rins.

O segundo objectivo foi o isolamento e identificação dos compostos químicos pertencentes à fracção do extracto aquoso de *I. crithmoides*, com uma maior actividade regeneradora e protectora.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Um total de 50 ratinhos machos adultos ICR-CDI (≈ 7 semanas) e com um peso corporal entre 30 – 40 g, foram adquiridos à Charles River Laboratories (L'Arbresle, França).

Os animais foram alojados em gaiolas individuais de plástico numa câmara climatizada a uma temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, fotoperíodo luz/escurecimento de 12/12h e a uma humidade relativa de 40 – 60%. Todos os animais tiveram livre acesso à ração e água *ad libitum*. Após um período de aclimatização dos animais de cerca de 2 semanas ao ambiente acima referido, foram iniciados os trabalhos experimentais.

3.2 Tratamentos

O extracto aquoso de IC, fracções deste e o CCl_4 foram injectados por via subcutânea. Os veículos utilizados na administração do extracto e do tóxico, foram o NaCl (0,9 %) e o azeite, respectivamente.

Em todos os grupos os animais foram sacrificados 24 h após a última injeção. Após a dissecação dos animais, foram recolhidas os órgãos em estudo, fígado, baço e rim. Todos os órgãos foram lavados com uma solução de NaCl (0,9 %). O rim direito, baço e um pequeno fragmento do fígado foram processados para estudos histológicos.

3.3 Ensaios histopatológicos

As amostras do fígado, baço e rim foram fixadas em formol a 10 % durante um período de 48/72 h e desidratadas em concentrações crescentes de álcool. De seguida, as amostras foram mergulhadas no benzol (diafanização). Após este procedimento, procedeu-se à impregnação e inclusão das amostras em parafina (ponto de fusão 42-44°C e 52°-58°C, respectivamente). Efectuaram-se cortes num micrótomo Leitz modelo 1512, com uma espessura de 4 μm . Estes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), montados em meio Eukitt (contém xileno) e mantidos na estufa a 40°C durante 2 dias. Por último foram

observados ao microscópio óptico (Olympos modelo BX41TF) com sistema fotográfico acoplado.

3.4 Análise estatística

Os valores do peso dos animais e do peso relativo dos órgãos estudados, foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.5 Avaliação do efeito protector e regenerador do extracto aquoso de *Inula crithmoides*

3.5.1 Colheita dos espécimes vegetais e preparação do extracto aquoso

Porções aéreas (inflorescências, folhas e caules) de IC foram colhidas no estado de frutificação numa zona de salgado da ria de Aveiro, Portugal. Após a colheita efectuou-se a secagem à temperatura ambiente.

O extracto aquoso foi preparado por decocção do material vegetal seco como descrito por Abdel-Wahhab *et al.* (2008). Inicialmente procedeu-se à trituração e homogeneização do material vegetal seco. De seguida, 1 g do material vegetal foi fervido em 100 mL de água destilada durante 10 min. Após o arrefecimento do extracto aquoso durante 15 min, procedeu-se à filtração, inicialmente usando gaze como meio filtrante e posteriormente recorrendo a uma bomba de vácuo, com filtro de 0,2 μ m (Whatman® Schleicher & Schuell®). Por último, o filtrado foi congelado a -80 °C durante 18 h, liofilizado durante 48 h e conservado num exsiccador com sílica gel.

3.5.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos com 5 ratinhos em cada. Os grupos experimentais foram os seguintes:

Grupo I – Controlo positivo com CCl₄, numa única dose de 0,5 mL/Kg e sacrificado após 24h.

Grupo II – Controlo negativo com NaCl 0,9 %, num volume de 250 µL durante 5 dias (uma vez por dia).

Grupo III – Tratamento com o extracto aquoso de IC numa dose de 250 mg/Kg durante 5 dias (uma vez por dia).

Grupo IV – CCl₄ + IC. No primeiro dia procedeu-se à administração do CCl₄ na dose de 0,5 mL/Kg. Nos 10 dias seguintes foi administrado o extracto aquoso de IC na dose de 250 mg/Kg.

Grupo V – CCl₄ + IC. A dose de CCl₄ administrada foi de 0,5 mL/Kg no primeiro dia. Nos 5 dias seguintes foi administrado o extracto aquoso de IC na dose de 500 mg/Kg.

Grupo VI – IC + CCl₄. O extracto aquoso de IC foi administrado durante 10 dias na dose de 250 mg/Kg e no 11º dia foi administrado o CCl₄ na dose de 0,5 mL/Kg.

3.6 Avaliação do efeito regenerador de quatro fracções do extracto aquoso de *Inula crithmoides*

3.6.1 Preparação das fracções a partir do extracto aquoso

Neste passo, o extracto aquoso de IC foi fraccionado por solubilidade a quente em solventes de diferentes polaridades, tendo-se obtido quatro fracções (as fracções de acetona, de etanol, de etanol:água (50:50) e por ultimo o resíduo). Inicialmente procedeu-se à preparação do extracto aquoso liofilizado como referido no ponto 3.5.1, partindo de 20 g de planta obteve-se 5,395 g de extracto aquoso liofilizado. De seguida este extracto aquoso foi sucessivamente fraccionado, tendo em conta a sua solubilidade em acetona, etanol e etanol:água (50:50) usando um sistema em refluxo durante 20 min, com renovação de solvente (2x200 mL em cada caso). Cada uma das fracções foi separadamente levada à secura num evaporador rotativo a pressão reduzida. Depois de secos, cada uma destas três fracções mais o resíduo (parte que não se dissolveu), foram testados nos ratinhos, com o objectivo de saber qual destas fracções possui maior actividade.

3.6.2 Grupos experimentais

Como se pretendia avaliar qual a fracção do extracto aquoso com maior actividade regeneradora, a dosagem usada em todos os grupos experimentais foi a seguinte:

- CCl_4 + fracção de extracto aquoso de IC. A dose de CCl_4 administrada foi de 0,5 mL/Kg no primeiro dia. Nos 5 dias seguintes foi administrada a fracção de extracto aquoso na dose de 250 mg/Kg.

Grupo I – CCl_4 + fracção de acetona.

Grupo II – CCl_4 + fracção de etanol.

Grupo III – CCl_4 + fracção de etanol:água (50:50)

Grupo IV – CCl_4 + resíduo.

3.7 Isolamento e identificação dos compostos químicos da fracção de etanol:água (50:50)

3.7.1 Solventes utilizados

Os solventes utilizados na obtenção dos extractos e das fracções, assim como os reagentes e solventes utilizados na reacção de acetilação eram analiticamente puros (PA). Os solventes usados no isolamento e purificação dos compostos foram todos destilados.

O solvente usado no registo dos espectros de RMN foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3).

3.7.2 Tipo de sílica usada nas cromatografias

As condições cromatográficas usadas para o fraccionamento, purificação dos compostos por cromatografia em coluna (cc) e cromatografia em camada fina (TLC) preparativa, foram optimizadas por tlc analítico, em folhas plastificadas revestidas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck.

A fase estacionária usada na cromatografia em coluna foi sílica gel 60 da Merck, de granulometria 230-400 mesh.

Os TLC preparativos foram realizados em placas de vidro (20x20 cm), previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 GF₂₅₄ da Merck, com uma espessura de 0,5 mm e activadas a 115 °C durante 12 a 16 horas. A visualização das manchas correspondentes aos compostos, foi conseguida por observação das placas de TLC preparativo à luz ultravioleta a 254 e/ou 366 nm.

3.7.3 Equipamento usado

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, DEPT, HMBC, HSQC e COSY foram obtidos num espectrómetro de ressonância magnética nuclear, BRUKER AVANCE -300, a operar a 300,13 MHz para o ¹H e 75,47 MHz para ¹³C. Os desvios químicos são expressos em δ (ppm) relativamente ao tetrametilsilano (TMS) usado como padrão interno.

Os espectros de massa dos compostos foram obtidos num espectrómetro Q-TOF 2 operando em ESI modo positivo. Os dados obtidos a partir dos espectros são apresentados em termos da razão massa/carga (*m/z*) dos iões correspondentes.

3.7.4 Estudo fitoquímico da fracção etanol:água (50:50) obtida a partir do extracto aquoso das porções aéreas de *I. crithmoides*

3.7.4.1 Acetilação da fracção em estudo

A fracção etanol:água (50:50) (2,983 g) foi acetilada com o objectivo de diminuir a polaridade dos compostos presentes. A reacção de acetilação teve a duração de 24 horas e foi utilizada a piridina como solvente e o anidrido acético (5 mL) como agente acetilante. Para terminar a reacção foi adicionado gelo e ácido clorídrico diluído para destruir o excesso de anidrido acético e de piridina. De seguida procedeu-se a uma extracção líquido-líquido com acetato de etilo, tendo este sido evaporado à secura num evaporador rotativo. O resíduo obtido foi designado por fracção acetilada.

3.7.4.2 Fraccionamento cromatográfico

A fracção acetilada (940 mg) foi fraccionada por cromatografia em coluna, usando eluentes de polaridade crescente: CHCl_3 (200 mL), CHCl_3 : AcOEt 4:1 (400 mL), 1:1 (600 mL), 1:2 (750 mL), 1:3 (500 mL), 1:5 (240 mL), AcOEt (800 mL), CH_3OH (400 mL). Deste fraccionamento foram recolhidas 57 fracções, tendo sido agrupadas em 14 fracções (Fr1-Fr14), de acordo com as similaridades demonstradas por tlc analítico. As fracções 5 e 7, recolhidas da coluna anterior, revelaram ser os compostos **2**, (20 mg) e **1**, (10 mg) respectivamente. A fracção Fr2 foi purificada por TLC usando como eluente CHCl_3 : AcOEt (3:1), tendo sido obtido o composto **3** (30 mg). Do fraccionamento por TLC da fracção Fr6, foram obtidos os compostos **2** (10 mg) e **1** (10 mg), usando como eluente CHCl_3 : AcOEt (2:1).

3.7.5 Dados espectroscópicos dos compostos isolados da fracção acetilada de *Inula crithmoides*

Ácido 3,4 – diacetoxi-cinâmico (**1**)

RMN de ^1H : 2,32 (6H, s, CH_3CO); 6,40 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H- α); 7,25 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5); 7,39 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-2); 7,44 (1H, dd, $J = 1,9$ e $8,4$ Hz, H-6); 7,71 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H- β).

RMN de ^{13}C : 20,7 (CH_3CO); 118,3 (C- α); 122,9 (C-2); 124,0 (C-5); 126,7 (C-6); 132,9 (C-1); 142,4 (C-3)*; 143,7 (C-4)*; 144,8 (C- β); 168,0 (CH_3CO)**; 168,1 (CH_3CO)**; 170,2 (COOH).

* Estes assinalamentos podem estar trocados

** Estes assinalamentos podem estar trocados

EM/ MS-TOF: m/z 287 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**4-*O*-(1',2',3',4'-tetra-*O*-acetil)frutofuranosil]-1,2,3,6-tetra-*O*
acetilfrutofuranose - D (2)**

RMN de ^1H : 2,10 (3H, s, CH_3CO); 2,11 (3H, s, CH_3CO); 2,12 (6H, s, CH_3CO); 2,13 (9H, s, CH_3CO); 2,16 (3H, s, CH_3CO); 4,21-4,14 (5H, m, H-1, 2 x H-1', H-5', H-6'); 4,34-4,26 (2H, m, H-1, H-6); 4,38-4,36 (1H, m, H-5); 4,48-4,40 (2H, m, H-6, H-6'); 4,98 (1H, dd, $J = 2,0$ e $5,0$ Hz, H-4); 5,31 (1H, t, $J = 5,4$ Hz, H-4'); 5,32 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-3); 5,37 (1H, d, $J = 5,4$ Hz, H-3').

RMN de ^{13}C : 20,7 (8 x CH_3CO); 63,2 (C-6'); 64,3* (C-1); 64,6* (C-6); 65,3 (C-1'); 76,1 (C-3'); 76,5 (C-4'); 77,7 (C-4); 79,0 (C-5'); 80,2 (C-5); 80,3 (C-3); 101,5 (C-2'); 103,8 (C-2); 171,1-169,1 (8 x CH_3CO).

*Estes assinalamentos podem estar trocados

EM/ MS-ESI-TOF: m/z 701 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito protector e regenerador do extracto aquoso de *Inula crithmoides*

4.1.1 Comportamento dos animais ao longo da experiência

No grupo I (controlo positivo) após a administração do CCl₄, verificou-se uma acentuada diminuição da actividade dos animais, inclusive na sua alimentação e o pêlo ficou muito mais áspero que o normal.

Nos animais do grupo II (NaCl) e III (IC) não se observaram alterações quer no seu comportamento, quer na sua fisionomia ao longo da experiência.

No grupo IV, os sintomas revelados após a administração do tóxico aos animais foram idênticos aos verificados no grupo I. Quando se iniciou a administração do extracto, a mobilidade dos animais e a textura do pêlo foram melhorando ao longo do tempo. No entanto, ocorreu a morte de um animal ao 3º dia.

No grupo V, os sintomas apresentados pelos animais ao longo do tratamento foram semelhantes aos do grupo IV. Tal como aconteceu no grupo IV, ocorreu a morte de um animal ao 3º dia.

Relativamente aos animais do grupo VI, não se verificaram alterações no seu comportamento e na sua fisionomia durante a administração do extracto. Após a injeção do tóxico a actividade dos animais diminui e o pêlo tornou-se mais áspero.

4.1.2 Efeito no peso corporal e peso relativo dos órgãos

No presente estudo verificou-se que a administração do tóxico interfere com o peso corporal dos ratinhos. Pelo contrário, a administração do extracto aquoso de IC não teve qualquer efeito na ingestão de alimento (Tabela I).

No grupo IV, observou-se um aumento do peso corporal ao longo da experiência (Tabela I). No grupo V, em que administração do extracto só ocorreu durante 5 dias, o peso foi menor, quando comparado com o de ratinhos no início da experiência. O peso corporal dos animais do grupo VI aumentou ao longo da experiência.

Tabela I: Evolução do peso corporal dos ratinhos ao longo da experiência nos diferentes grupos

Grupos	Peso Corporal (g)	
	Início	Fim
I (CCl₄)	38,40 ± 1,98	36,25 ± 1,06
II (NaCl)	31,29 ± 1,11	30,65 ± 0,92
III (IC)	32,20 ± 1,16	32,05 ± 1,45
IV (CCl₄ + IC)	30,61 ± 1,50	33,90 ± 1,00
V (CCl₄ + IC)	34,72 ± 1,70	33,70 ± 3,49
VI (IC + CCl₄)	31,40 ± 1,77	35,83 ± 0,90

^a os valores representados referem-se à média ± DP

A Tabela II mostra que não existem diferenças no peso do baço e rins entre os animais dos diferentes grupos. Relativamente ao fígado encontraram-se algumas diferenças. De notar uma ligeira diferença de peso do fígado dos grupos II e III quando comparado como peso dos grupos I, V e VI. O peso do fígado foi maior no grupo VI.

Tabela II: Peso relativo dos órgãos nos diferentes grupos

Grupos	Rácios (peso relativo dos órgãos) (g/100g de peso corporal)			
	Fígado	Baço	Rim D.	Rim E.
I (CCl₄)	5,52 ± 0,46	0,19 ± 0,02	1,07 ± 0,10	1,05 ± 0,04
II (NaCl)	4,69 ± 0,17	0,27 ± 0,02	0,93 ± 0,07	0,89 ± 0,06
III (IC)	4,68 ± 0,17	0,32 ± 0,02	0,84 ± 0,07	0,82 ± 0,06
IV (CCl₄ + IC)	5,19 ± 0,43	0,27 ± 0,05	1,00 ± 0,12	0,98 ± 0,13
V (CCl₄ + IC)	6,07 ± 0,74	0,24 ± 0,04	0,98 ± 0,09	0,95 ± 0,10
VI (IC + CCl₄)	6,14 ± 0,36	0,35 ± 0,05	1,03 ± 0,11	0,99 ± 0,02

^a os valores representados referem-se à média ± DP

4.1.3 Observação macroscópica dos órgãos

A análise macroscópica dos órgãos de animais do grupo I (CCl₄) revelou alterações evidentes das suas características normais. O fígado apresentou uma cor escura, aspecto rugoso e hemorragias. Os rins apresentaram uma cor esbranquiçada e hemorragias evidentes. O baço apresentou uma diminuição na sua consistência elástica. Os órgãos dos animais do grupo II (NaCl) e III (IC) apresentaram as características normais, assim como uma cor apropriada, consistência elástica e uma textura superficial lisa.

A análise de órgãos do grupo IV e V, revelou a sua cor apropriada, uma superfície lisa e consistência elástica, excepto o baço. Este órgão evidenciou esplenomegalia. No entanto, o aumento do volume do baço e a diminuição da consistência elástica foi mais evidente no grupo IV. Relativamente ao grupo VI, todos os órgãos evidenciaram características semelhantes às do grupo I. O fígado e os rins apresentaram hemorragias e aspecto rugoso. No baço observou-se uma diminuição na sua consistência elástica e ocorrência de esplenomegalia.

4.1.4 Análise histológica

4.1.4.1 Fígado

Os resultados obtidos através da análise histológica do fígado são apresentados na figura 3.

No tratamento com CCl₄ (fig. 3A), observou-se necrose centrolobular e consequente perda da morfologia do lóbulo hepático. Observaram-se ainda hemorragias, infiltrados inflamatórios, esteatose e uma desorganização dos cordões e sinusóides hepáticos.

Tanto no controlo negativo (fig. 3B) como no tratamento com IC (fig. 3C), o fígado apresentou a sua morfologia normal.

Nos grupos IV (fig. 3D) e V (fig. 3E) que tiveram como objectivo avaliar um possível efeito regenerador do extracto de IC, verificou-se uma melhoria significativa das lesões provocadas pelo CCl₄. De notar, uma diminuição ou quase ausência de necrose centrolobular, hemorragias, infiltrados inflamatórios e esteatose. Observou-se ainda uma

reorganização dos cordões e sinusóides hepáticos. Embora a diminuição da extensão de necrose centrolobular e de infiltrados inflamatórios fosse mais evidente no grupo IV que no grupo V, a extensão dos focos hemorrágicos foi maior no grupo IV.

Por último, no grupo VI (fig. 3F) que teve como finalidade avaliar um possível efeito protector do extracto, não se observaram melhorias nas lesões provocadas pelo CCl₄ e a morfologia hepática mostrou ser semelhante àquela verificada no tratamento com o tóxico (grupo I).

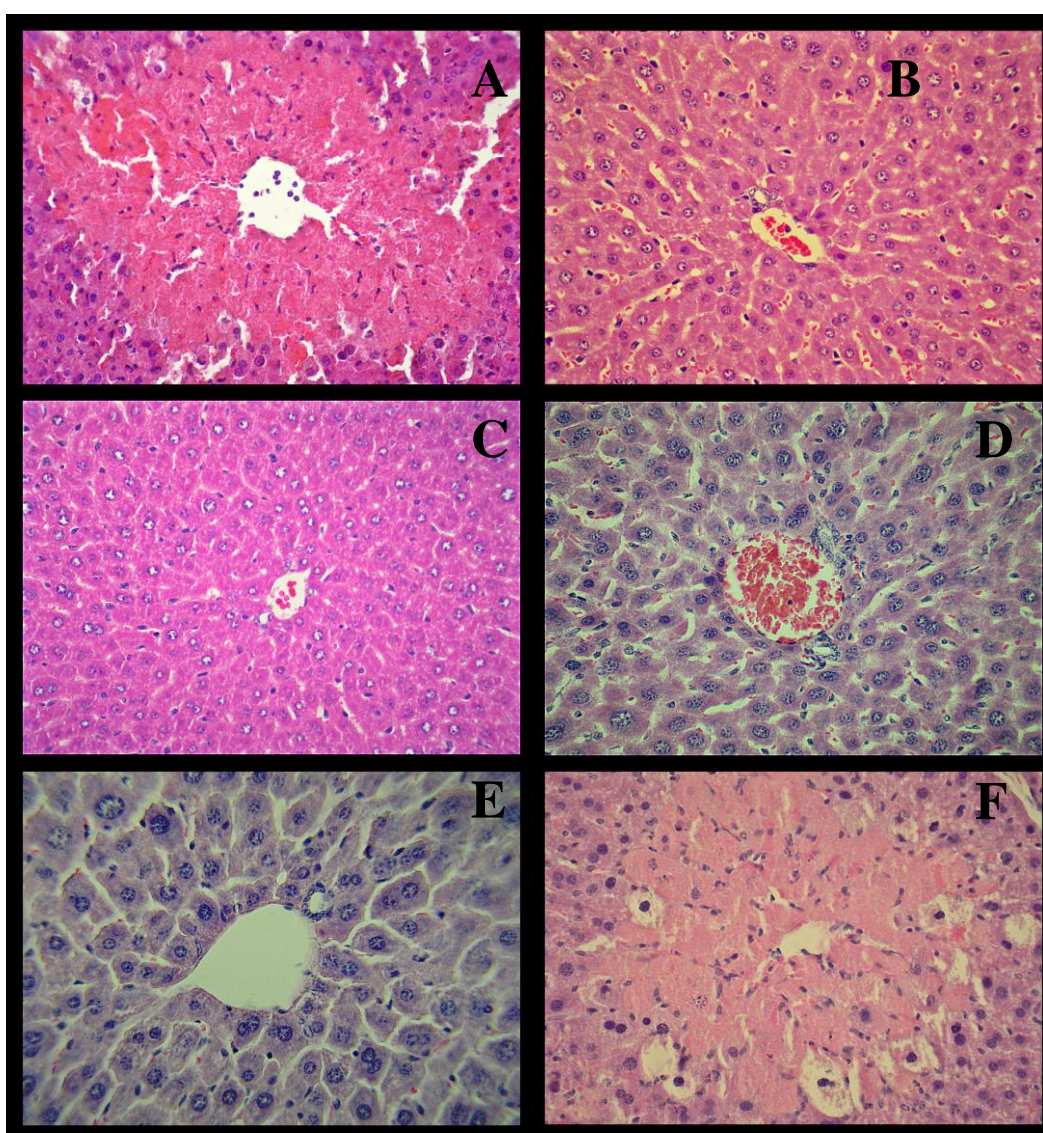


Figura 3: Efeitos do extracto aquoso de *Inula crithmoides* (IC) na toxicidade induzida pelo CCl₄ no fígado de ratinhos. (A) Animais administrados com CCl₄ (0,5 mL/Kg); (B) Grupo de controlo; (C) Grupo IC; (D) Grupo CCl₄ + IC (10 dias); (E) Grupo CCl₄ + IC (5 dias); (F) IC (10 dias) + CCl₄. Coloração H&E (x400).

4.1.4.2 Rim

No tratamento com CCl_4 (fig. 4A), verificou-se uma desorganização estrutural do rim, pois existe dificuldade em distinguir a zona cortical da medular, um grande número de hemorragias e infiltrados inflamatórios, hipertrofia tubular e uma alteração na estrutura dos glomérulos.

Através da análise histológica, observou-se que os rins dos animais do controlo negativo (fig. 4B) e do tratamento com o extracto de IC (fig. 4C), apresentaram uma estrutura organizada e uma perfeita distinção entre a zona cortical e medular.

Nos grupos IV (fig. 4D) e V (fig. 4E), os rins apresentaram ligeiras melhorias em relação ao tratamento com CCl_4 . No grupo IV conseguiu-se uma distinção entre a zona cortical e medular enquanto que no grupo V existiu essa dificuldade. Por outro lado, verificou-se que as extensões das hemorragias pareceram ser maiores no grupo IV que no grupo V.

No grupo VI (fig. 4F), não se visualizaram melhorias nas lesões provocadas pelo CCl_4 e a morfologia renal apresentou-se idêntica àquela verificada no controlo positivo.

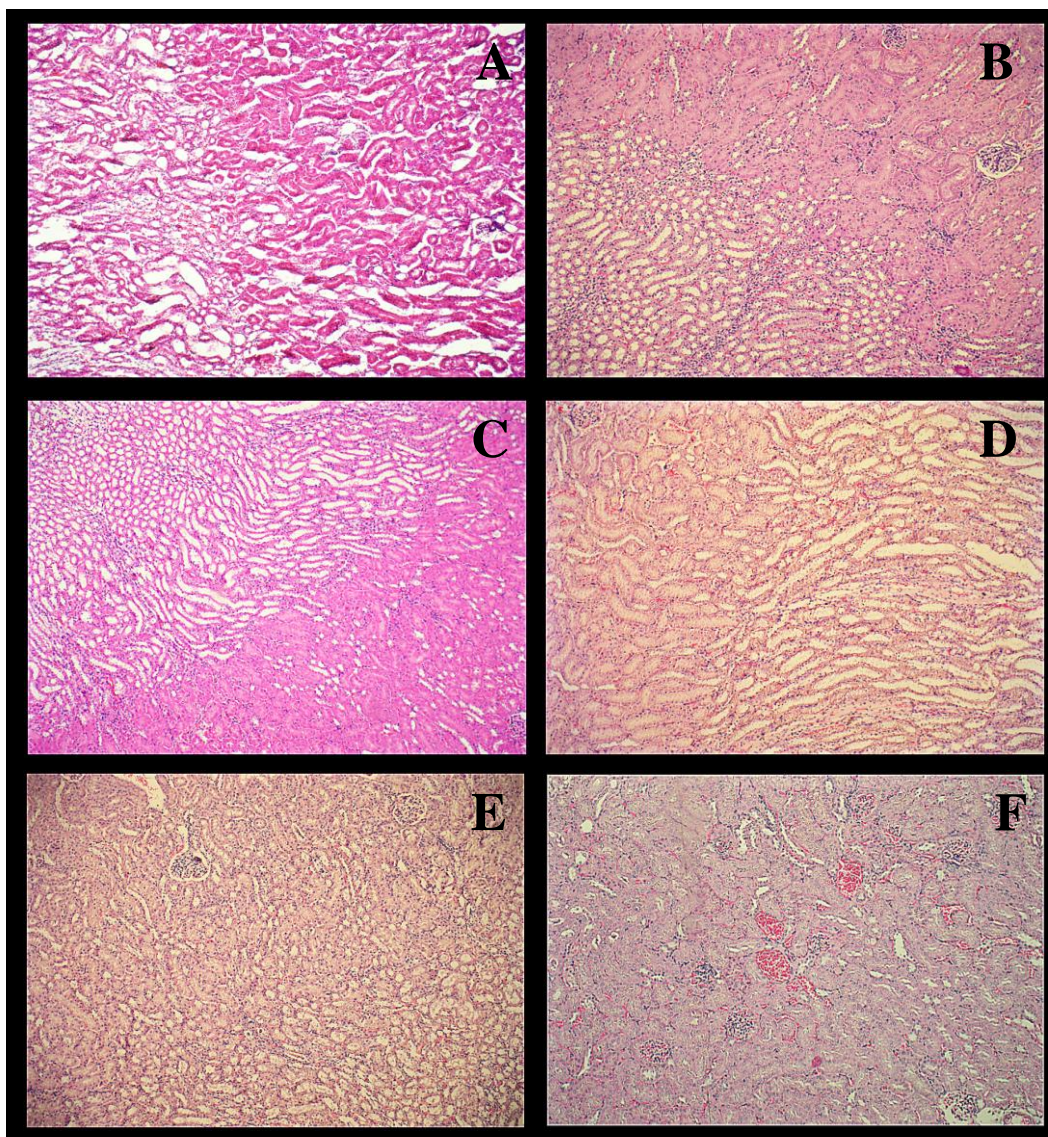


Figura 4: Efeitos do extracto aquoso do *Inula crithmoides* (IC) na toxicidade induzida pelo CCl₄ nos rins de ratinhos. (A) Animais submetidos ao CCl₄ (0,5 mL/Kg); (B) Grupo de controlo; (C) Grupo IC; (D) Grupo CCl₄ + IC (10 dias); (E) Grupo CCl₄ + IC (5 dias); (F) IC (10 dias) + CCl₄. Coloração H&E (x100).

4.1.4.3 Baço

Os resultados obtidos através da análise histológica do baço são apresentados na figura 5.

No grupo do CCl₄ (fig. 5A), observou-se hiperplasia da polpa vermelha, hemorragias e a presença de um maior número de linfócitos e macrófagos quando comparado com os grupos onde foi administrado o NaCl e o extracto aquoso.

O baço dos animais do grupo NaCl (fig. 5B) e do grupo de IC (fig. 5C) apresentaram uma morfologia normal, nomeadamente a ausência de hemorragias e uma distribuição normal entre a polpa branca e a polpa vermelha. No entanto, observou-se uma ligeira hiperplasia da polpa vermelha no tratamento com o extracto.

Nos grupos IV (fig. 5D) e V (fig. 5E) continuou-se a observar hiperplasia da polpa vermelha, embora em menor extensão que aquela verificada no controlo positivo (grupo CCl₄), hemorragias e a presença de um grande número de linfócitos e macrófagos.

Por último, o baço dos animais do grupo VI (fig. 5F) evidenciou uma morfologia parecida àquela verificada no grupo do CCl₄. Não foi possível uma perfeita distinção entre a polpa vermelha e branca, e a presença de linfócitos e macrófagos foi menos acentuada do que aquela verificada nos grupos IV e V.

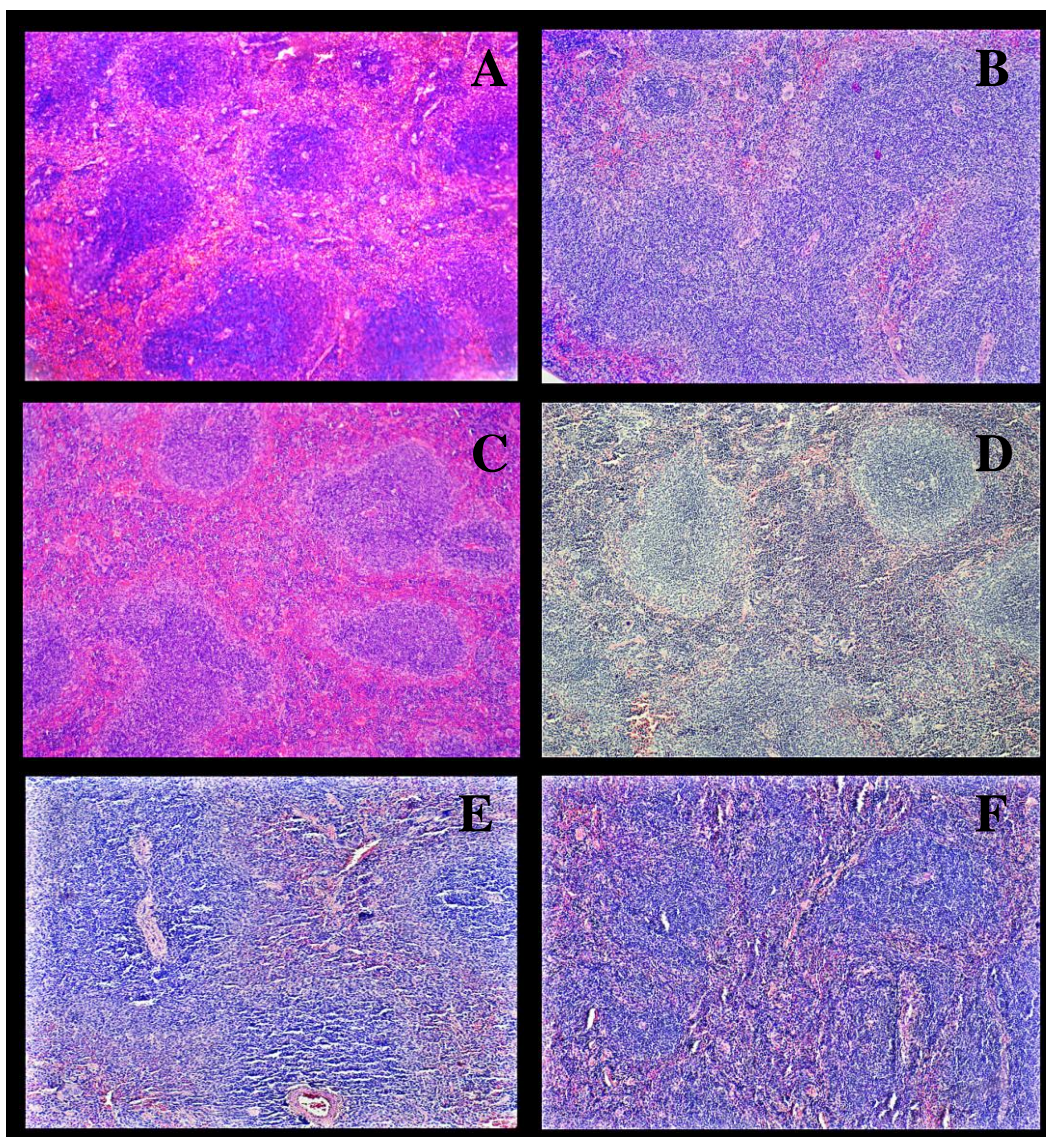


Figura 5: Efeitos do extracto aquoso *Inula crithmoides* (IC) na toxicidade induzida pelo CCl₄ no baço de ratinhos. (A) Animais administrados com CCl₄ (0,5 mL/kg); (B) Grupo de controlo; (C) Grupo IC; (D) Grupo CCl₄ + IC (10 dias); (E) Grupo CCl₄ + IC (5 dias); (F) IC (10 dias) + CCl₄. Coloração H&E (x100).

4.2 Avaliação do efeito regenerador de quatro fracções do extracto aquoso de *Inula crithmoides*

4.2.1 Comportamento dos animais ao longo da experiência

Após a administração do tóxico, observou-se em todos os grupos uma acentuada diminuição da actividade dos animais, um decréscimo do seu peso corporal e o pêlo tornou-se mais áspero.

No grupo I, verificou-se uma ligeira melhoria no comportamento dos animais, embora não muito significativo, após a administração da fracção de acetona do extracto aquoso. Os animais mantiveram-se sempre com pouca actividade ao longo da experiência. Neste grupo morreram dois animais ao longo da experiência.

No grupo II, o comportamento dos animais ao longo da experiência foi muito semelhante ao verificado no grupo I. Tal como no grupo anterior, morreram dois animais ao longo da experiência.

No grupo III, após a injeção da fracção de etanol:água (50:50) os animais evidenciaram uma melhoria significativa na sua actividade ao longo da experiência, inclusive na sua alimentação. Neste grupo não ocorreram morte de animais, contrariamente ao sucedido nos grupos anteriores.

Relativamente aos animais do grupo IV, verificou-se uma melhoria na sua mobilidade e no seu comportamento após administração do resíduo, embora essa melhoria não fosse tão significativa como no grupo III. Tal como nos grupos I e II, dois animais morreram ao longo da experiência.

4.2.2 Efeito no peso corporal e peso relativo dos órgãos

Já vimos anteriormente que a administração do tóxico interfere com o peso corporal. Vamos ver agora quais os efeitos que as diferentes fracções de extracto aquoso de IC administradas, têm no peso corporal dos ratinhos.

No grupo I e no grupo III, o peso corporal dos ratinhos manteve-se constante ao longo da experiência (Tabela III). No grupo II, verificou-se um ligeiro aumento do peso

corporal ao longo da experiência, enquanto que no grupo IV o peso foi menor no final da experiência quando comparado com o de ratinhos no início da experiência.

Tabela III: Evolução do peso corporal dos ratinhos ao longo da experiência nos diferentes grupos

Grupos	Peso Corporal (g)	
	Início	Fim
I (Fracção de acetona)	36,08 ± 2,94	35,23 ± 1,20
II (Fracção de etanol)	33,46 ± 1,17	35,27 ± 1,50
III (Fracção de etanol:água)	34,26 ± 1,17	34,13 ± 1,41
IV (Resíduo)	35,10 ± 2,02	32,83 ± 4,37

^a os valores representados referem-se à média ± DP

Na Tabela IV constata-se que não existem diferenças no peso relativo dos rins entre os animais dos diferentes grupos. Relativamente ao peso relativo do baço, observou-se que este foi maior no grupo IV quando comparado com os três grupos restantes. O peso relativo do fígado apresentou um valor superior no grupo I, sendo idêntico nos grupos III e IV (Tabela IV).

Tabela IV: Peso relativo dos órgãos nos diferentes grupos

Grupos	Rácios (peso relativo dos órgãos) (g/100g de peso corporal)			
	Fígado	Baço	Rim D.	Rim E.
I (Fracção de acetona)	6,56 ± 1,08	0,24 ± 0,03	0,94 ± 0,15	0,87 ± 0,19
II (Fracção de etanol)	5,84 ± 0,29	0,25 ± 0,03	0,83 ± 0,04	0,79 ± 0,07
III (Fracção de etanol:água)	5,40 ± 0,67	0,23 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,80 ± 0,09
IV (Resíduo)	5,36 ± 0,47	0,47 ± 0,06	0,90 ± 0,18	0,85 ± 0,13

^a os valores representados referem-se à média ± DP

4.2.3 Observação macroscópica dos órgãos

A análise macroscópica dos órgãos de animais do grupo I revelou alterações evidentes. Assim, o fígado revelou uma coloração muito escura, aspecto rugoso e hemorragias evidentes. Os rins apresentaram algumas hemorragias e uma cor escura. No baço observou-se uma diminuição na sua consistência elástica. Os órgãos deste grupo evidenciaram características parecidas com aquelas verificadas no grupo do CCl₄.

Nos grupos II e III, os órgãos em estudo apresentaram características normais, semelhantes às do grupo controlo (NaCl).

Por fim, os órgãos dos animais do grupo IV apresentaram também algumas alterações, nomeadamente algumas hemorragias no fígado e rins, embora não tão evidentes como as do grupo I. No baço observou-se uma diminuição na sua consistência elástica e esplenomegalia. Todos os órgãos deste grupo apresentaram uma cor esbranquiçada.

4.2.4 Análise histológica

4.2.4.1 Fígado

No grupo I (fig. 6C) observou-se que a fracção de acetona não teve qualquer efeito hepatoregenerador na toxicidade induzida pelo CCl₄. A morfologia hepática apresentou-se semelhante àquela verificada no tratamento com CCl₄, sendo as lesões observadas mais intensas do que as verificadas no grupo submetido apenas ao CCl₄ (nomeadamente a intensidade de hemorragias, infiltrados inflamatórios e esteatose).

No grupo II (fig. 6D), observaram-se alguns efeitos regeneradores induzidos pela fracção de etanol do extracto aquoso de IC. Apesar de ainda se observar necrose centrolobular, esta era de menor intensidade quando comparada com o grupo I e com o tratamento com CCl₄. Hemorragias, infiltrados inflamatórios e esteatose apresentaram uma intensidade menor do que aquela verificada no grupo anterior e ainda se observou uma ligeira reorganização do lóbulo hepático.

No grupo III (fig. 6E), foram evidentes as melhorias induzidas pela fracção de etanol:água (50:50). O fígado revelou uma morfologia semelhante ao grupo do NaCl (controlo negativo). Observou-se uma quase completa reorganização dos cordões e

sinusóides hepáticos. Contudo, foram observados pequenos focos hemorrágicos e infiltrados inflamatórios.

O fígado dos animais do grupo IV (fig. 6F) apresentou uma morfologia idêntica à verificada no grupo III, embora com maior intensidade de hemorragias e de infiltrados inflamatórios.

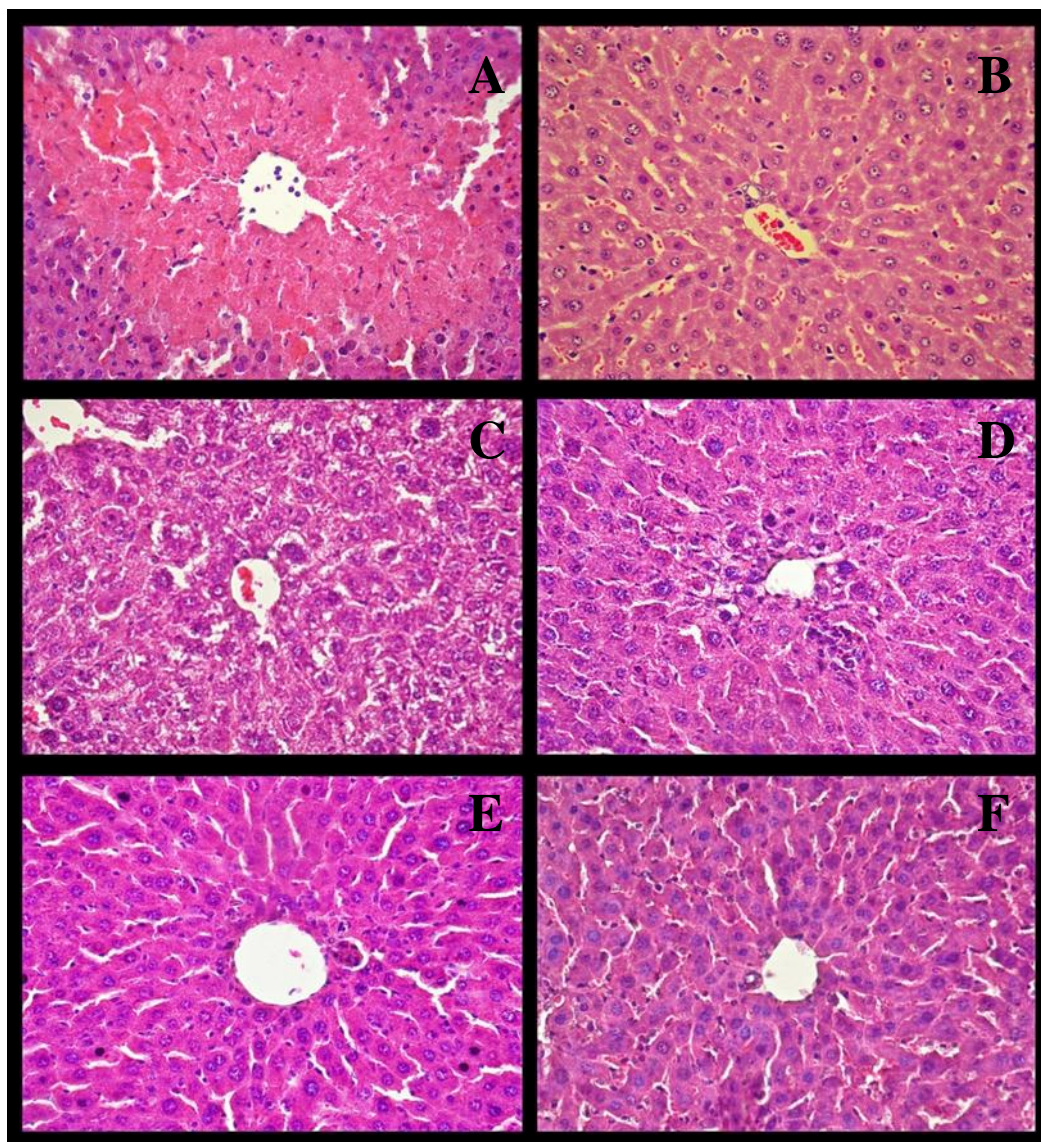


Figura 6: Efeitos das fracções do extracto aquoso de *Inula crithmoides* (IC) na toxicidade induzida pelo CCl₄ no fígado de ratinhos. (A) Animais administrados com CCl₄ (0,5 mL/Kg); (B) Grupo controlo; (C) Grupo da fracção de acetona; (D) Grupo da fracção de etanol; (E) Grupo da fracção de etanol:água (50:50); (F) Grupo do resíduo. Coloração H&E (x400).

4.2.4.2 Rim

A morfologia renal dos animais do grupo I (fig. 7C) apresentou-se idêntica à do controlo positivo (CCl₄) (fig. 7A). Embora a hipertrofia tubular não fosse tão acentuada, observou-se hemorragias e infiltrados inflamatórios, alteração na estrutura dos glomérulos e dificuldade em distinguir a zona cortical da zona medular.

Os rins dos animais do grupo II (fig. 7D) e do grupo III (fig. 7E), apresentaram ligeiras melhorias em relação ao grupo I. Observou-se uma reorganização estrutural do rim, sendo nítida a distinção entre a zona cortical e a medular. Esta característica foi mais evidente no grupo III. A hipertrofia tubular não foi tão acentuada como no grupo I.

No grupo IV (fig. 7F), a morfologia renal apresentou-se semelhante àquela verificada no grupo I e no grupo do CCl₄.

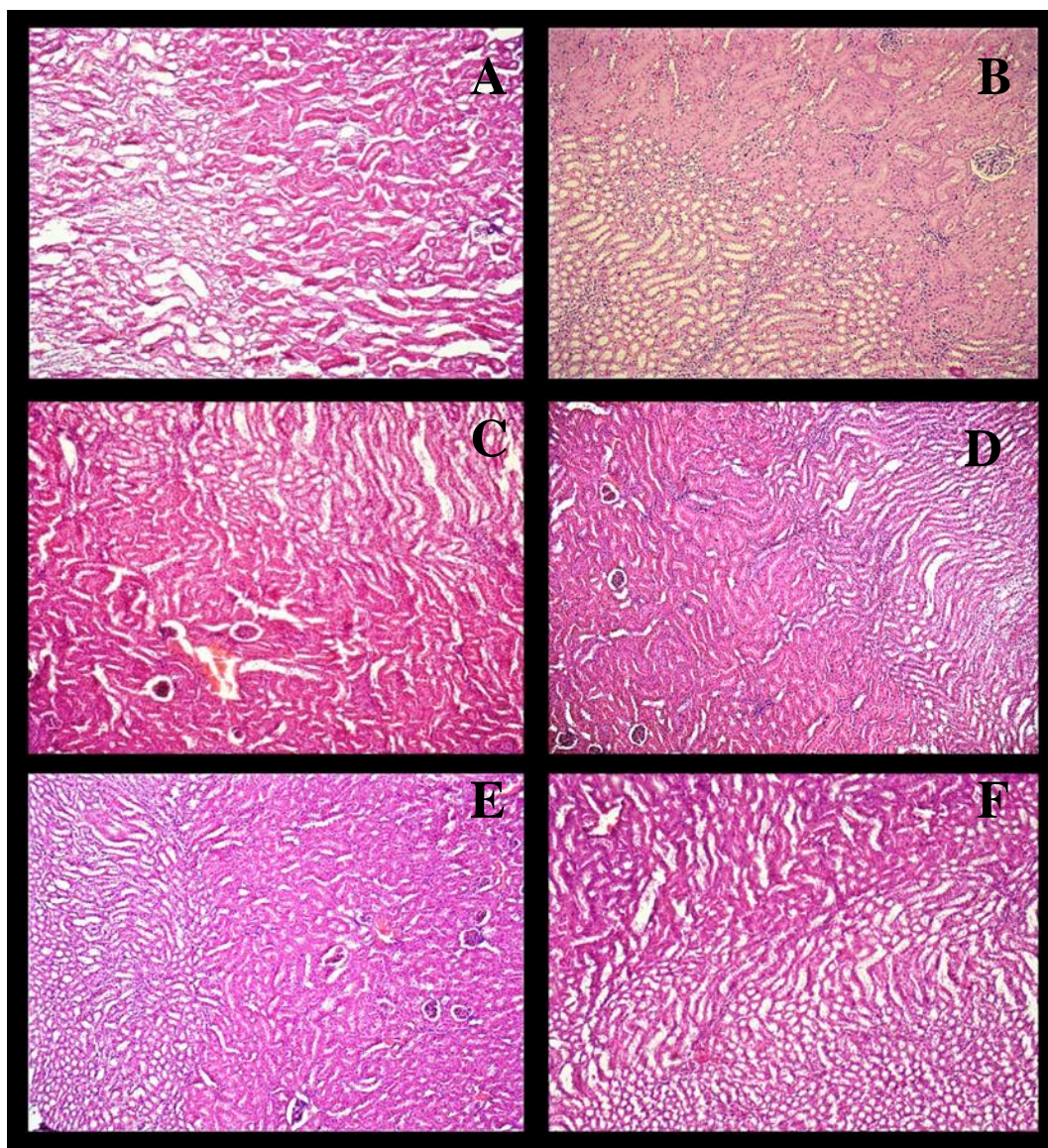


Figura 7: Efeitos das fracções do extracto aquoso de *Inula crithmoides* (IC) na toxicidade induzida pelo CCl₄ nos rins de ratinhos. (A) Animais submetidos ao CCl₄ (0,5 mL/Kg); (B) Grupo controlo; (C) Grupo da fracção de acetona; (D) Grupo da fracção de etanol; (E) Grupo da fracção de etanol: água (50:50); (F) Grupo do resíduo. Coloração H&E (x100).

4.2.4.3 Baço

No grupo I (fig. 8C) observou-se hiperplasia da polpa vermelha, ocorrência de hemorragias e a presença de linfócitos e macrófagos. Quadro patológico semelhante ao do grupo do CCl₄ (fig. 8A).

O quadro patológico observado no grupo II (fig. 8D) é muito semelhante ao verificado no grupo I. No entanto, a extensão das hemorragias foi maior do que as ocorridas no grupo I.

No grupo III (fig. 8E) observou-se uma pequena diminuição da hiperplasia da polpa vermelha, e um ligeiro aumento do número de linfócitos e macrófagos. A extensão das hemorragias foi semelhante à ocorrida no grupo II.

O baço dos animais do grupo IV (fig. 8F) continuou a evidenciar hiperplasia da polpa vermelha. Verificou-se ainda que a extensão das hemorragias foram mais graves que as verificadas nos grupos anteriores, e um aumento no número de linfócitos e macrófagos relativamente aos outros grupos.

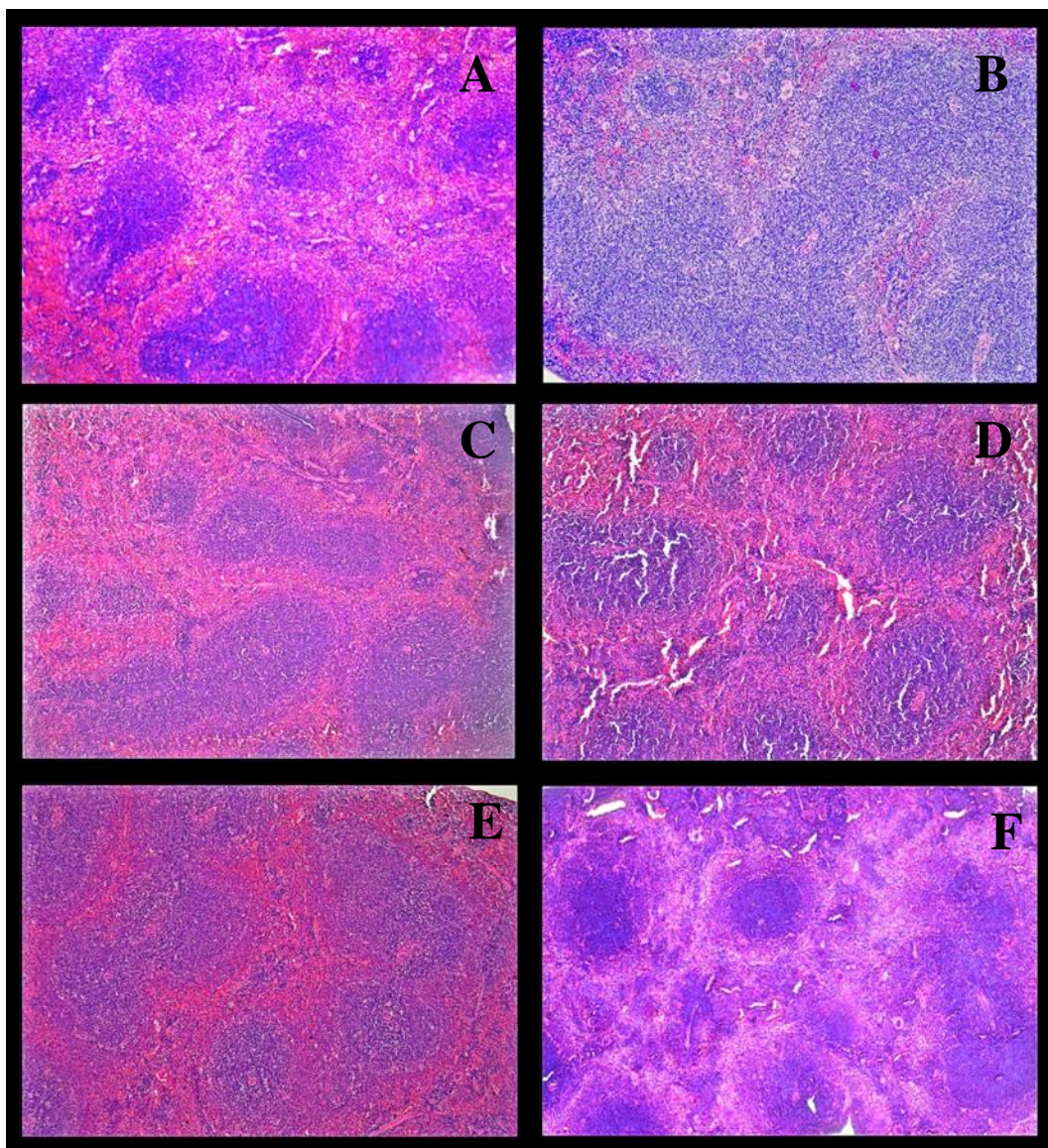


Figura 8: Efeitos das fracções do extracto aquoso de *Inula crithmoides* (IC) na toxicidade induzida pelo CCl_4 no baço de ratinhos. (A) Animais administrado com CCl_4 (0,5 mL/Kg); (B) Grupo controlo; (C) Grupo da fracção de acetona; (D) Grupo da fracção de etanol; (E) Grupo da fracção de etanol:água (50:50); (F) Grupo do resíduo. Coloração H&E (x100).

4.3 Caracterização estrutural dos compostos isolados a partir da fracção acetilada de *I. crithmoides*

Das fracções estudadas a que revelou maior actividade regeneradora foi a fracção etanol:água (50:50) e foi sobre esta que incidiu o estudo fitoquímico. Pretendeu-se isolar por técnicas cromatográficas e caracterizar estruturalmente por técnicas espectroscópicas, os compostos maioritários desta fracção e potenciais responsáveis pela actividade demonstrada.

Uma vez que a fracção em estudo é muito polar, relevou-se particularmente difícil proceder a separações cromatográficas usando como fase estacionária sílica gel. Assim, recorreu-se a uma transformação muito utilizada em química orgânica, acetilação, pela qual ocorre substituição de átomos de H de grupos hidroxilo (-OH) por grupos acetilo (CH₃CO-), de forma a tornar os compostos presentes menos polares.

Da fracção acetilada das porções aéreas de IC, isolaram-se os compostos **1**, **2** e **3**. Estes compostos foram estruturalmente caracterizados recorrendo a técnicas espectroscópicas, cujas principais evidências são apresentadas a seguir e que permitiram a identificação inequívoca da estrutura dos compostos **1** e **2**.

- Composto **1**

Os resultados obtidos por RMN de ¹H (fig. 9), permitiram concluir que o composto **1** possui na sua estrutura 3 prótons pertencentes a uma anel aromático substituído em *meta* e *para*, uma vez que, o espectro exhibe 3 sinais entre δ_H 7,45 ppm e 7,23 ppm, em forma de 2 dupletos e um duplo duplete ($J = 1,9$ e $8,4$ Hz) com um integral correspondente a um H cada. A existência de 2 sinais com integral proporcional a 1 H cada e em forma de duplete, com uma constante de acoplamento de 16,0 Hz cada, revela a presença de uma sistema α,β -insaturado em configuração *trans*. O espectro de RMN de ¹H possui ainda 2 sinais praticamente equivalentes, em forma de singuleto na zona correspondente à ressonância de prótons alifáticos (δ_H 2,32 ppm). Uma vez que este composto foi isolado de uma fracção acetilada é de prever a presença de grupos metilo, cuja ressonância dos respectivos prótons aparece caracteristicamente nesta zona do espectro e num sinal com a forma de singuleto.

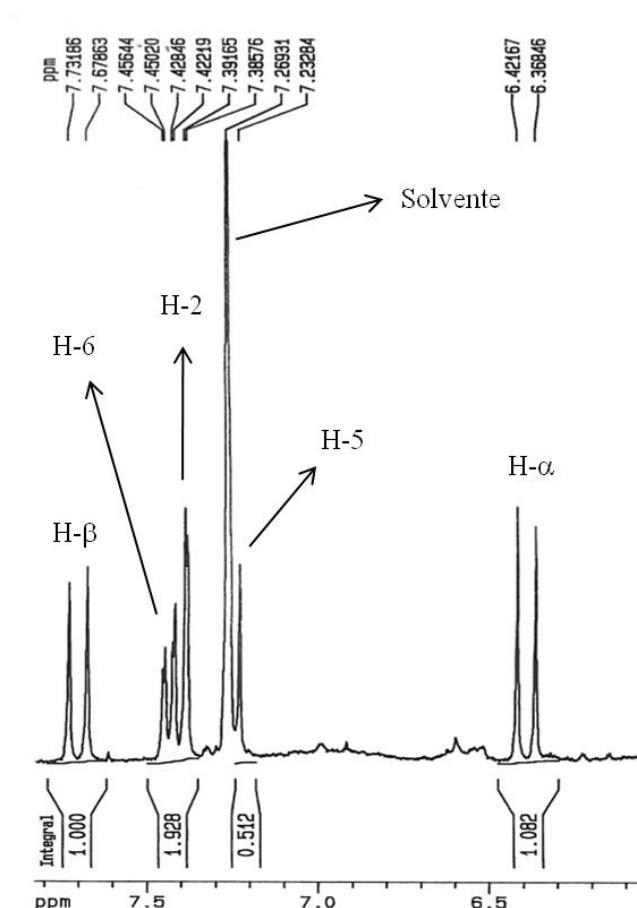


Figura 9: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **1**.

O espectro de RMN de ^{13}C (fig. 10), exibiu sinais atribuídos à ressonância de 12 carbonos distintos, correspondentes a 6 carbonos quaternários, carbonos de 5 grupos CH e um sinal cuja intensidade revela corresponder à ressonância de 2 carbonos metílicos equivalentes. O desvio químico a que surgiram os sinais correspondentes à ressonância dos carbonos quaternários, mostrou claramente que o composto **1** possui 3 carbonos carboxílicos (δ_{C} 168,0; 168,1 e 170,2 ppm), 2 carbonos quaternários pertencentes ao anel aromático e ligados a um átomo de oxigénio, e um carbono quaternário sp^2 ligado só a outros carbonos. Destes dados se confirma a existência de um anel aromático trissubstituído sendo os substituintes em dois casos átomos de oxigénio e um caso átomo de carbono.

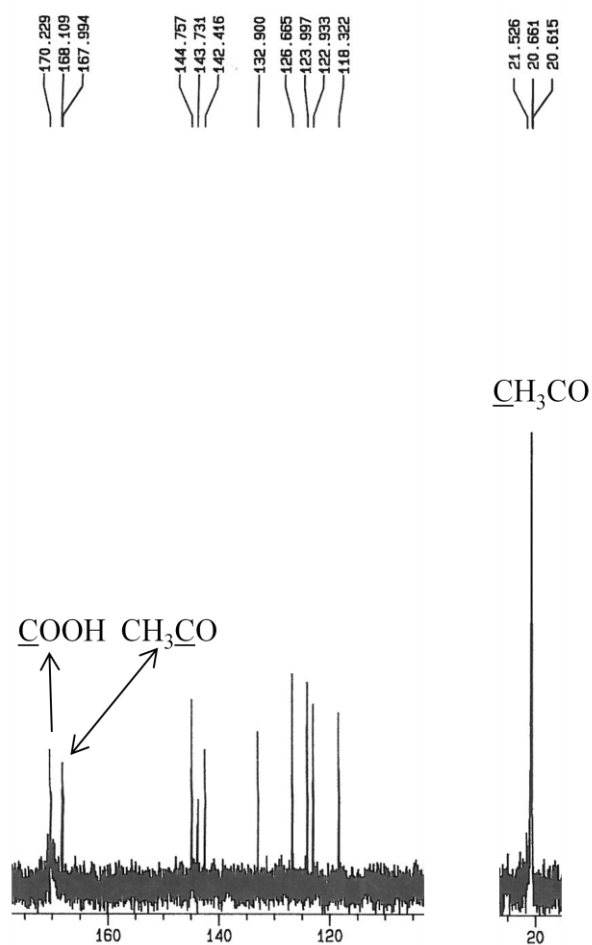


Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C do composto **1**.

O espectro de HSQC determina a correlação entre ^1H - ^{13}C à distância de uma ligação (fig. 11). Assim, a análise deste espectro permitiu determinar qual o desvio químico do sinal de ressonância do carbono que está ligado ao próton X. Na tabela V, são apresentadas as conclusões resultantes da análise do espectro de HSQC para o composto **1**.

Tabela V: Algumas correlações observadas no espectro de HSQC do composto **1**

$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)
6,40 (duplete, $J = 16,0$ Hz, H- α)	118,0
7,25 (duplete, $J = 8,4$ Hz, H-5)	124,0
7,39 (duplete, $J = 1,9$ Hz, H-2)	122,9
7,44 (duplo duplete, $J = 1,9$ e $8,4$ Hz, H-6)	126,7
7,71 (duplete, $J = 16,0$ Hz, H- β)	144,8

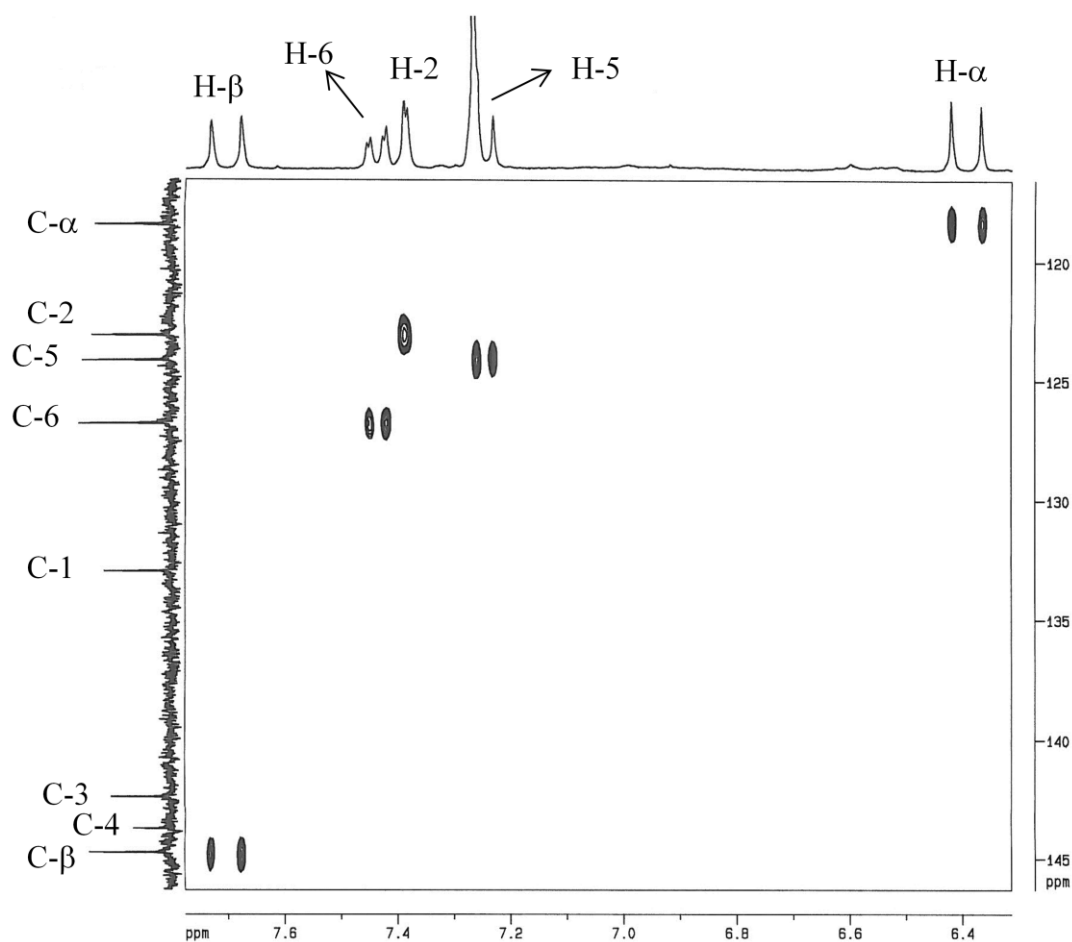


Figura 11: Ampliação do espectro de HSQC do composto **1**.

As conectividades ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HMBC (fig. 12), mostraram que os grupos metilo estão ligados aos carbonos carboxílicos cujas ressonâncias surgem a δ_{C} 168,0 e 168,1 ppm, confirmando a presença de dois grupos acetilo na estrutura do composto **1**.

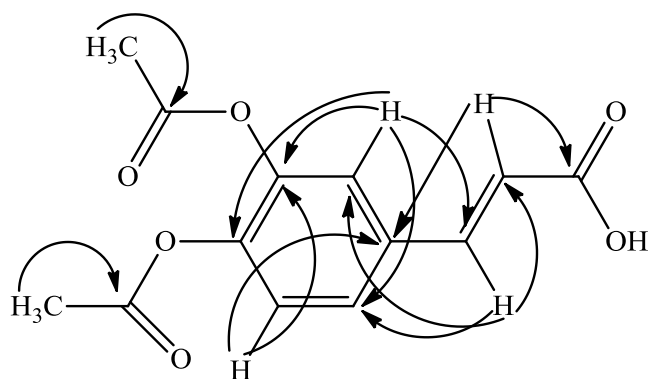


Figura 12: Conectividades ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HMBC do composto **1**.

O espectro de massa obtido por ESI em modo positivo revelou um pico a m/z 287 (fig. 13). Este valor juntamente com os dados já obtidos por análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (13 carbonos, pelo menos 11 hidrogénios e no mínimo 4 oxigénios), permitiu concluir que a fórmula molecular do composto **1** é $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_6$, (264 g/mol), sendo a diferença entre 264 e 287 devido à associação de um átomo de Na ao ião molecular, situação muito comum na técnica ESI modo positivo.

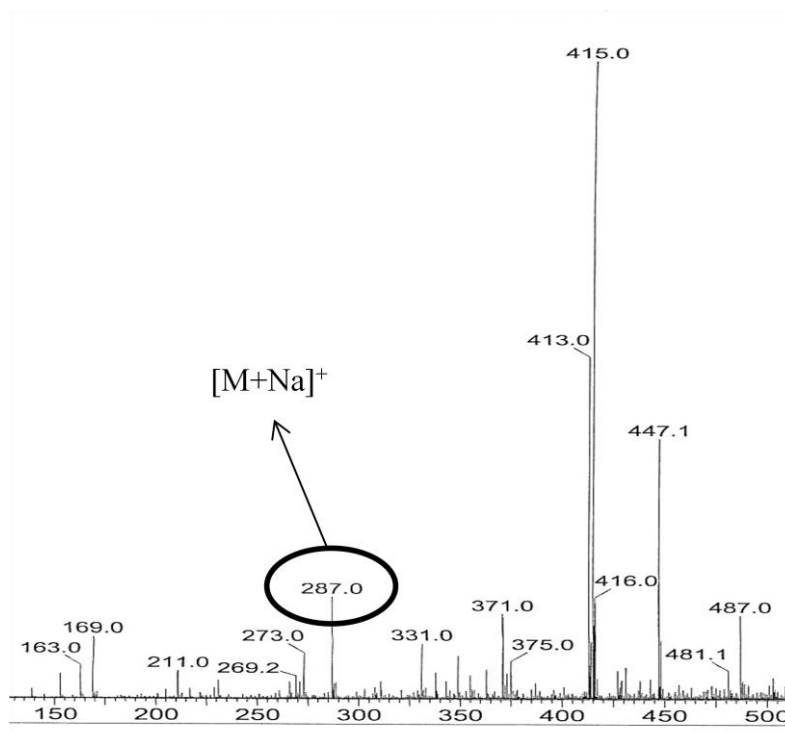


Figura 13: Espectro de massa do composto **1**.

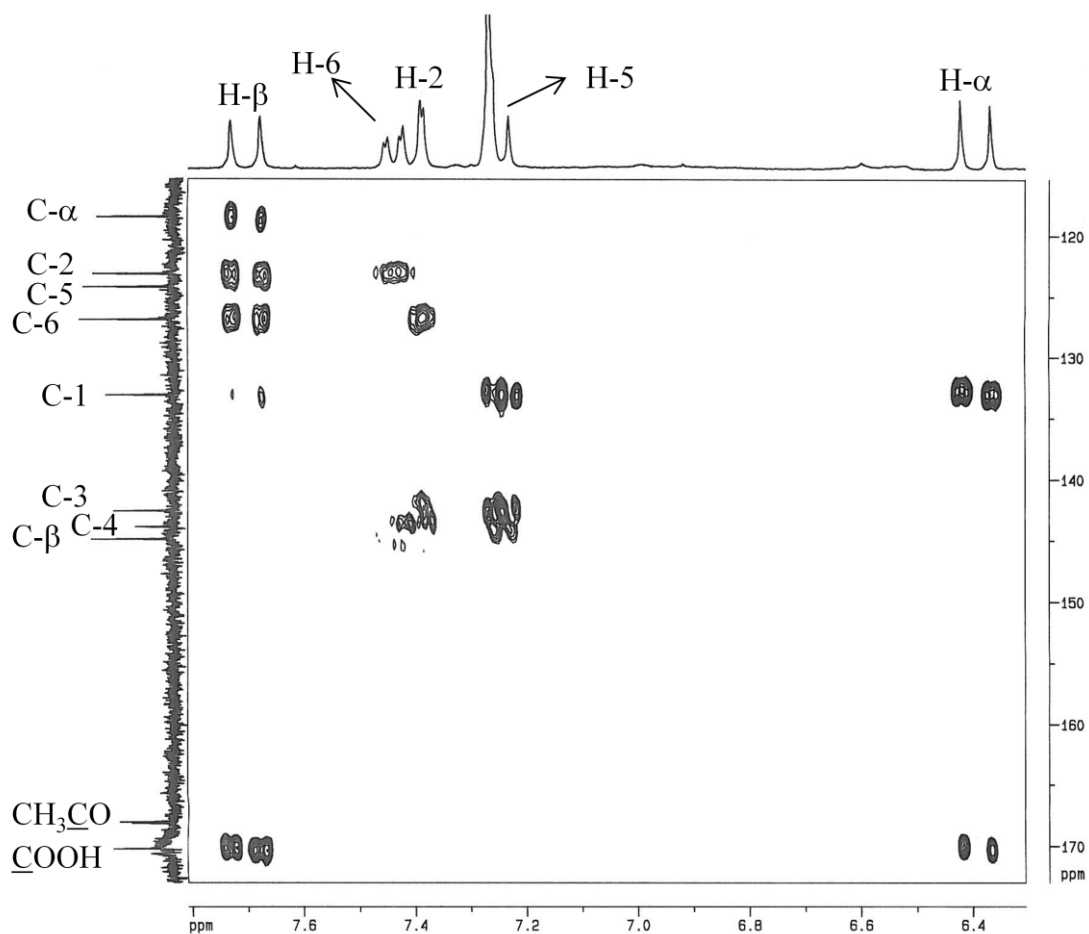
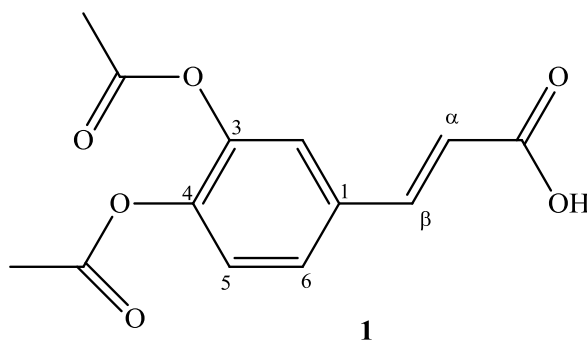


Figura 14: Conectividades exibidas pelo espectro de HMBC do composto **1**.

Os dados expostos até ao momento em conjunto com as conectividades observadas no espectro de HMBC (fig. 14 e já indicadas na fig. 12), confirmaram a estrutura do composto **1** como sendo o ácido 3,4-diacetoxi-cinâmico e permitiram o assinalamento inequívoco da ressonância de todos os prótons e carbonos da molécula.



- Composto **2**

Uma análise não detalhada dos espectros de RMN mono (^1H , ^{13}C , DEPT) e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC) do composto **2**, revelou que este composto possui uma estrutura com muito mais carbonos, sobretudo mais prótons e muitos deles em ambiente químico muito semelhante, mas não equivalentes. Os desvios químicos a que surgem a maioria dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons e carbonos (ver ponto 3.7.5), mostraram que o composto **2** pertence a uma família de compostos químicos completamente diferente da do composto **1**.

Vejamos pois, quais as evidências espectroscópicas que permitiram determinar a estrutura química do composto **2**:

- o espectro de RMN de ^1H (fig. 15), mostrou que a maioria dos sinais surge a um desvio químico entre δ_{H} 5,4 e 4,0 ppm, indicando que no composto **2** não existem anéis aromáticos, nem duplas ligações (caso em que os prótons surgiriam a desvios químicos superiores a 5,5 ppm), nem cadeias alifáticas tipo ácidos gordos saturados (caso em que a ressonância dos prótons surgiria tipicamente a desvios químicos δ_{H} 2,5-0,5 ppm), mas indica a existência de prótons ligados a carbonos desprotegidos pela presença muito próxima de elementos electronegativos, como o oxigénio. Fora deste intervalo surgiu apenas um conjunto de sinais em forma de singuleto entre δ_{H} 2,20 e 2,10 ppm, com integral proporcional a 24 prótons, que são indicação da existência na estrutura do composto **2** de prótons alifáticos pertencentes a 8 grupos metilo em ambiente químico muito semelhante.

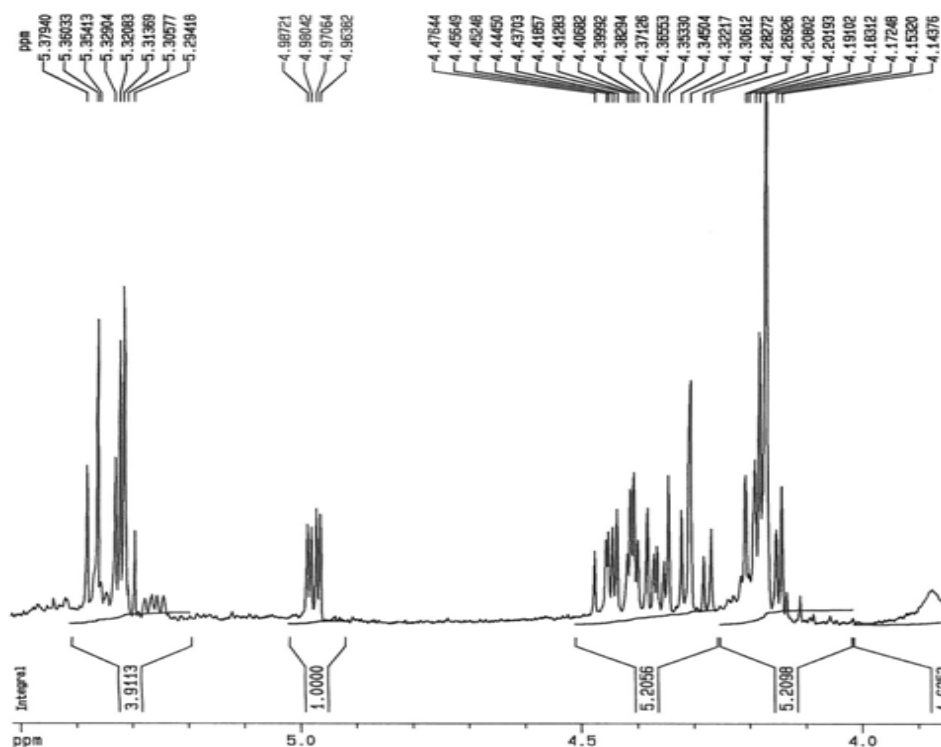


Figura 15: Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto **2**.

- a análise conjunta dos espectro de RMN ^{13}C e DEPT (fig. 16), revelou de forma inequívoca que o composto **2** possui na sua estrutura grupos metilo (δ_{C} 20,7 ppm), quatro carbonos hidroximetilénicos ($\text{CH}_2\text{-O-}$, δ_{C} 65,3-63,2 ppm), seis carbonos metínicos também ligados a oxigénio (CH-O- , δ_{C} 80,3-76,1 ppm) e dois carbonos quaternários oxigenados (O-C-O- , δ_{C} 103,8 e 101,4 ppm). Os referidos espectros revelaram ainda a presença de oito carbonos carboxílicos que pelo desvio químico apresentado (δ_{C} 171,1-169,1 ppm) são atribuídos a grupos carboxílicos do tipo éster. A presença destes carbonos carboxílicos em número igual ao dos grupos metilo, e sabendo que a fracção em estudo foi inicialmente acetilada, sugere que o composto **2** possui oito grupos acetilo, resultantes da acetilação de oito grupos hidroxilo que existiriam originalmente. As conectividades $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ observadas no espectro de HMBC, entre os prótons metílicos e os carbonos carboxílicos referidos acima, mostra de forma inequívoca a presença de grupos acetilo na estrutura do composto **2**.

Excluindo os carbonos dos grupos acetilo, conclui-se que o composto **2** possui doze carbonos.

A ligação glicosídica entre as duas unidades de cetohehexofuranose, estabelecida a partir das conectividades observadas no espectro de HMBC (fig. 17), ocorre entre o carbono 4 de uma unidade e o carbono 6 da outra unidade.

Os dados obtidos por ESI em modo positivo, revelaram um sinal para uma razão massa carga m/z 701, correspondente ao ião molecular mais um átomo de sódio, o que permitiu concluir que a fórmula molecular do composto **2** é $C_{28}H_{38}O_{19}$.

As conectividades 1H - ^{13}C a longa distância observadas no espectro de HMBC (fig. 17, a preto as conectividades para uma constante de acoplamento de 7,5 Hz e a vermelho para 2,5 Hz) permitiram o assinalamento de todos os prótons e carbonos da molécula e assim, elucidar completamente a estrutura do composto **2**.

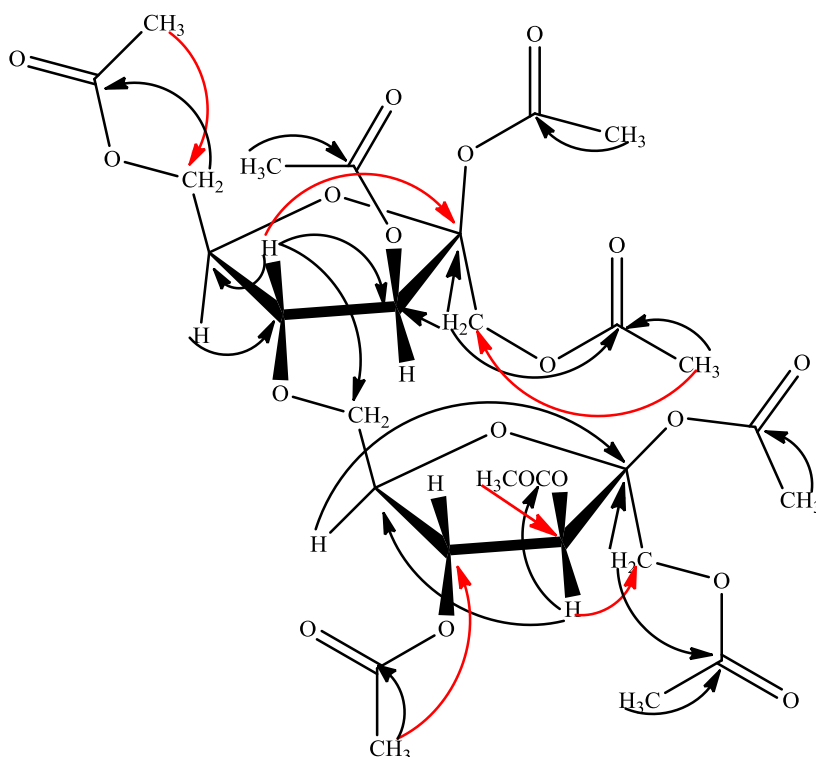
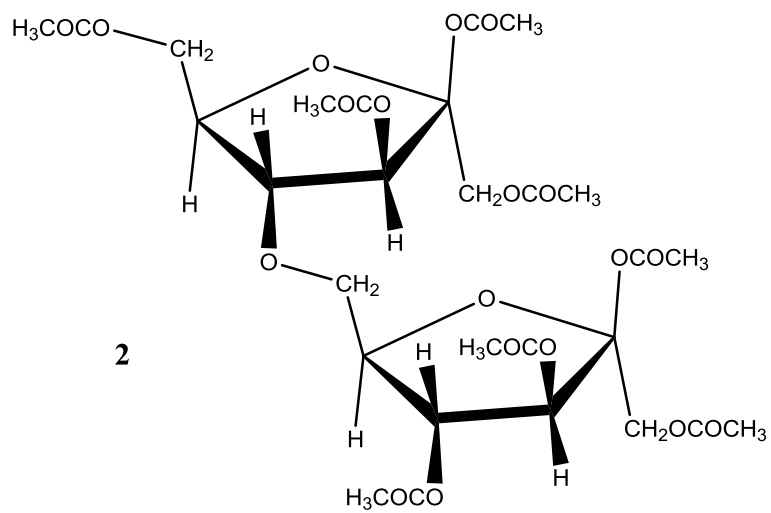


Figura 17: Conectividades 1H - ^{13}C observadas no espectro de HMBC do composto **2**.

O composto **2** é então um dímero de frutofuranose ligados por uma ligação 4→6, designado por 4-*O*-[6'-(1',2',3',4'-tetra-*O*-acetil)frutofuranosil]-1,2,3,6-tetra-*O*-acetilfrutofuranose - D e cuja estrutura é apresentada a seguir.



Relativamente ao composto **3**, não foi possível o assinalamento inequívoco de todos os prótons e carbonos da molécula, nem confirmar a sua estrutura química.

5. DISCUSSÃO

O tetracloreto de carbono tem sido estudado mais extensivamente, tanto a nível bioquímico como patológico, do que qualquer outro hepatotóxico (Hodgson, 2004). A toxicidade induzida pelo CCl₄, é o sistema modelo mais utilizado para o rastreio de actividades protectoras e regeneradoras por extractos vegetais e medicamentos (Srivastava & Shivanandappa, 2010).

No presente estudo, foram investigados os efeitos protectores e regeneradores do extracto aquoso de *I. crithmoides* na toxicidade induzida pelo CCl₄ em ratinhos machos. A dose de tóxico administrada aos ratinhos foi baseada na literatura existente (Ye *et al.*, 2009), assim como as doses de extracto (Santos, 2009).

Verificou-se que tóxico interfere com a alimentação dos ratinhos, pois era notória uma diminuição do peso corporal aquando da administração do mesmo. O extracto aquoso de IC não interferiu na alimentação e normal crescimento dos ratinhos. Nos grupos IV e VI, em que a administração do extracto aquoso ocorreu durante 10 dias, foi notório um aumento do peso corporal dos ratinhos (Tabela I). No grupo IV, em que se administrou previamente o CCl₄ e depois o extracto durante 10 dias, verificou-se uma recuperação do peso corporal dos ratinhos. Estes dados podem-nos indicar que o extracto reverteu o efeito de perda de peso causado pela administração do tóxico.

Relativamente ao peso relativo dos rins e baço, não existiram diferenças entre os diferentes grupos. Em relação ao fígado notaram-se algumas diferenças (Tabela II). No grupo IV, observou-se uma pequena diminuição do peso relativo do fígado em relação ao observado no controlo positivo, podendo indicar-nos que o extracto reverteu o efeito causado pelo CCl₄. Esta diminuição não foi observada por Santos (2009), levando-nos a pensar que o tempo de administração do extracto aquoso no presente trabalho, possa ter sido o factor determinante para a diminuição do peso relativo do fígado. No entanto, nos grupos V e VI verificou-se um aumento do peso do fígado relativamente ao grupo do CCl₄. Santos (2009) também observou este aumento de peso nos tratamentos com IC e a dosagem/tempo de administração do extracto foram 250 mg/Kg/5dias.

Quanto à análise histológica foram evidentes as lesões provocadas pelo CCl₄ nos órgãos analisados (fígado, baço e rins). A nível hepático as lesões observadas foram a necrose centrolobular, esteatose, hemorragias e infiltrados inflamatórios. A esteatose

observada após a administração do CCl_4 , é em grande parte atribuída à falha do mecanismo de secreção de triglicéridos dos hepatócitos (Plaa, 2000). Também se verificaram alterações histopatológicas a nível renal, nomeadamente hemorragias, infiltrados inflamatórios, hipertrofia tubular e alterações na estrutura dos glomérulos. No baço, as alterações verificadas foram hemorragias, hiperplasia da polpa vermelha e um aumento do número de linfócitos e macrófagos.

A administração do extracto aquoso de IC na dose de 250 mg/Kg não provocou qualquer lesão nos órgãos estudados. Apenas foi observado no baço uma ligeira hiperplasia da polpa vermelha.

No grupo IV (CCl_4 + 250 mg/Kg/10 dias de IC) e no grupo V (CCl_4 + 500 mg/Kg/5 dias de IC), apesar de se terem observado ligeiras melhorias nos rins e no baço, não podemos afirmar que o extracto aquoso possui um efeito regenerador nestes órgãos. Relativamente ao fígado, em ambos os grupos as melhorias provocadas pela administração do extracto aquoso de IC foram evidentes. De referir uma diminuição significativa da necrose centrolobular, hemorragias, esteatose e de infiltrados inflamatórios. Este efeito hepatoregenerador por parte do extracto aquoso de IC, também foi observado por Santos (2009), embora a dose administrada fosse de 250 mg/Kg/5 dias. Apesar de se ter observado um efeito hepatoregenerador nos dois grupos, essas melhorias foram mais evidentes no grupo IV, daí que o factor tempo de administração, possa ser mais determinante que a dosagem administrada para o efeito hepatoregenerador observado neste estudo. Uma vez que o fígado possui uma grande capacidade de regeneração, não podemos afirmar que este efeito hepatoregenerador se deva exclusivamente à administração do extracto aquoso de IC.

Através da análise histológica do grupo VI, verificou-se que o extracto aquoso não apresentou um efeito protector nos órgãos estudados, dado que não se observou qualquer melhoria nas lesões provocadas pelo CCl_4 . Santos (2009), concluiu que a administração do extracto aquoso de IC na dose de 250 mg/Kg durante 5 dias não possuiu qualquer efeito hepatoprotector. No presente estudo, apesar de aumentar o tempo de administração do extracto aquoso para o dobro (10 dias), continuou-se a verificar que este não possuiu efeito hepatoprotector na dose de 250 mg/Kg.

Visto que o extracto aquoso não possuiu uma actividade protectora, na segunda parte do trabalho avaliou-se qual das quatro fracções do extracto aquoso de IC, possui uma maior actividade regeneradora nos órgãos estudados.

Em relação ao peso corporal, apenas a fracção de resíduo (grupo IV) (parte que não se dissolveu) não reverteu a perda de peso causada pela administração do CCl_4 , dado que o peso dos animais foi diminuindo ao longo da experiência (Tabela III). Nos grupos I e III o peso manteve-se constante ao longo da experiência, enquanto que no grupo II houve um ligeiro aumento do peso corporal no ratinhos.

Quanto ao peso relativo dos órgãos, verificou-se que nos rins não existiram diferenças entre os grupos. No peso relativo do baço, observou-se uma diferença do grupo IV (fracção de resíduo) em relação aos outros grupos e ao controlo positivo (CCl_4). A fracção de resíduo poderá ter potenciado a acção tóxica do CCl_4 no baço. O peso relativo do fígado foi diminuindo ao longo dos grupos. De notar que no grupo I (fracção de acetona) e grupo II (fracção de etanol) o peso foi maior do que o verificado no controlo positivo. As diferenças de peso do fígado no grupo III e IV em relação ao controlo positivo, não permitem admitir que estas fracções provocaram melhorias nas lesões causadas pelo CCl_4 .

Os dados histológicos de todos os órgãos do grupo I evidenciaram um quadro patológico muito semelhante ao do CCl_4 . A actividade regeneradora neste grupo foi nula, levando-nos a concluir que as substâncias activas não estão presentes nesta fracção.

No grupo II, começaram a verificar-se algumas melhorias provocadas pela fracção de etanol. No fígado, verificou-se uma diminuição da intensidade das lesões provocadas pelo CCl_4 . No rim também se verificaram ligeiras melhorias e o baço apresentou um quadro patológico muito semelhante ao do grupo do CCl_4 e do grupo da fracção de acetona.

Em relação ao grupo III, a administração da fracção de etanol:água (50:50) nos ratinhos produziu melhorias significativas nas lesões provocadas pelo tóxico no fígado. Apesar de ainda se observarem pequenos focos hemorrágicos e infiltrados inflamatórios, não se verificou necrose centrolobular e esteatose. Nos rins e no baço, as melhorias verificadas foram ligeiramente superiores às do grupo II. Contudo, estes dados não confirmam um efeito regenerador nestes órgãos.

No grupo IV, embora se tivesse verificado uma recuperação quase total da necrose centrolobular e esteatose por parte dos animais, tal como no grupo III, observou-se que a extensão das hemorragias e infiltrados inflamatórios, foram mais graves em relação às verificadas no grupo anterior. Nos rins observou-se um quadro patológico semelhante ao do grupo do CCl₄ e no baço a intensidade das lesões foram maiores do que aquelas verificadas nos grupos anteriores. A extensão das lesões observadas no baço deste grupo, vieram comprovar a diferença do peso relativo deste órgão em relação aos outros grupos.

Face a estes resultados, a análise histológica revelou-nos que a fracção de etanol: água (50:50) (grupo III) foi a que apresentou uma maior actividade regeneradora, principalmente no fígado, tendo por isso sido esta fracção estudada do ponto de vista fitoquímico.

Como foi referido anteriormente, a fracção de etanol:água (50:50) foi sujeita a uma reacção de acetilação, de forma a tornar os compostos presentes menos polares.

Os compostos isolados e caracterizados estruturalmente da fracção acetilada de IC foram o ácido 3,4-diacetoxi-cinâmico (**1**) e o 4-*O*-[6'-(1',2',3',4'-tetra-*O*-acetil)frutofuranosil]-1,2,3,6-tetra-*O*-acetilfrutofuranose - D (**2**).

O ácido 3,4-diacetoxi-cinâmico (**1**) corresponde ao ácido 3,4-di-hidroxicinâmico depois de sofrer acetilação dos seus grupos hidroxilos aromáticos. Ora, como se procedeu à acetilação da fracção em análise, poderemos concluir que o composto que existiria originalmente na planta seria o ácido 3,4-di-hidroxicinâmico. A pesquisa efectuada revela que este é o segundo derivado de ácido cinâmico isolado no género *Inula*, tendo sido isolado anteriormente de *I. grandis* pequenas quantidades de ácido cinâmico (Nikonova & Gusakova, 1972).

No ponto 1.2 desta tese referiu-se que, compostos polidispersos de poli-frutose como a inulina, foram já isolados de outras espécies de *Inula* (Bell & Palmer, 1952; Khodzhaeva & Kondratenko, 1982). No entanto, não há qualquer referência à existência de ligações 4→6 na cadeia principal ou em ramificações de derivados de inulina, extraídos de espécies *Inula* ou de outros géneros. Assim, deduz-se que o composto **2** não resulta da hidrólise de um derivado da inulina, mas sim um composto biossinteticamente distinto. Esta poderá ser a primeira vez que se isola um dímero de frutose com ligação 4→6.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente estudo, através da análise histológica concluiu-se que a dose administrada de CCl₄ (0,5 mL/Kg) provoca lesões graves nos órgãos estudados, enquanto que o extracto aquoso de *Inula crithmoides* revelou não possuir toxicidade na dose de 250 mg/Kg.

Os dados histológicos permitiram concluir que o extracto aquoso de IC não revelou qualquer efeito protector, nas condições experimentais consideradas. Por isso, em estudos futuros devem ser utilizadas outras condições experimentais (dose e tempo de administração) para verificar se realmente este extracto possui um efeito protector. Contudo, o estudo com extracto aquoso de IC sugere um efeito hepatoregenerador. Futuramente devem ser realizados ensaios bioquímicos, para confirmar o possível efeito hepatoregenerador observado no presente estudo por parte do extracto aquoso.

A análise histológica das quatro fracções do extracto aquoso de IC, revelou-nos que a fracção de etanol:água (50:50), é aquela que apresentou uma maior actividade regeneradora, principalmente no fígado. No entanto, estudos bioquímicos devem ser realizados para complementar a informação dada pela análise histológica.

O estudo fitoquímico da fracção mais activa permitiu o isolamento de três compostos e a caracterização estrutural de apenas dois (ácido 3,4-diacetoxi-cinâmico e 4-*O*-[6'-(1',2',3',4'-tetra-*O*-acetil)frutofuranosil]-1,2,3,6-tetra-*O*-acetilfrutofuranose - D). O facto de serem só três compostos isolados e em pequena quantidade, revela por um lado que as condições cromatográficas não foram as mais adequadas ao estudo desta fracção tão polar e por outro, que a quantidade de extracto inicial foi muito pequena. Em estudos futuros deve ser utilizada uma maior quantidade de extracto e utilizar uma outra técnica para isolamento dos compostos, por exemplo o HPLC. Os compostos isolados não foram testados para avaliar a sua actividade regeneradora, logo não se pode concluir que o efeito hepatoregenerador induzido pela fracção etanol:água (50:50) se deva a algum destes três compostos. Futuramente deve administrar-se individualmente estes compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Wahhab MA, Abdel-Azim SH, El-Nekeety AA (2008). *Inula crithmoides* extract protects against ochratoxin A-induced oxidative stress, clastogenic and mutagenic alterations in male rats. *Toxicon* 52:566–573.

Abou-Jawdah Y, Sobh H, Salameh A (2002). Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (11):3208-3213.

Abraham P, Wilfred G, Cathrine SP (1999). Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clinica Chimica Acta* 289:177-179.

Al-Dissi NM, Salhab AS, Al-Hajj HA (2001). Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 77:117-121.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2005). Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride. Atlanta, GA: Public Health Service.

Bai N, Lai CS, He K, Zhou Z, Zhang L, Quan Z, Zhu N, Zheng QY, Pan MH, Ho CT (2006). Sesquiterpene lactones from *Inula britannica* and their cytotoxic and apoptotic effects on human cancer cell lines. *Journal of Natural Products* 69 (4):531-535.

Balunas MJ, Kinghorn AD (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78:431-441.

Barrachina MD, Bello R, Esplugues J, Sanz I, Yúfera EP (1995). Pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Inula crithmoides* L. *Phytotherapy Research* 9 (4):294-298

Bell DJ, Palmer A (1952). Structural studies on inulin from *Inula helenium* and on levans from *Dactylis glomerata* and *Lolium italicum*. *Journal of the Chemical Society* 3763-3770.

Blanc MC, Muselli A, Bradesi P, Casanova J (2004). Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 19:314-319.

Boron WF, Boulpaep EL (2005). *Medical Physiology*. Elsevier Saunders. Philadelphia.

Causey JL, Feirtag JM, Gallaher DD, Tunland BC, Slavin JL (2000). Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutrition Research* 20 (2):191-201.

El-Lakany AM, Aboul Ela MA, Hammada HM, Ghazy NM, Mahmoud ZF (1996). New methoxylated flavonols from *Inula crithmoides* L. *Pharmazie* 51 (6):435-436.

Fischer NH, Lu T, Cantrell CL, Castaneda-Acosta J, Quijano L, Franzblau SG (1998). Antimycobacterial evaluation of germacranolides. *Phytochemistry* 49 (2):559-564.

Franco JA (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Volume II. Lisboa.

Giamperi L, Bucchini A, Fraternale D, Genovese S, Curini M, Ricci D (2010). Composition and antioxidant activity of *Inula crithmoides* essential oil grown in central Italy (Marche region). *Natural Product Communications* 5 (2):315-318.

Goyal R, Chhabra BR, Kalsi PS (1990). Three oxygenated alantolides from *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 29 (7):2341-2343.

Guinoiseau E, Luciani A, Rossi PG, Quilichini Y, Ternengo S, Bradesi P, Berti L (2010). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29:873-879.

Gurib-Fakim A (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27:1–93.

Han M, Wen J, Zheng B, Zhang DQ (2004). Acetylbritannilaton suppresses NO and PGE₂ synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression. *Life Sciences* 75:675-684.

Harzallah-Skhiri F, Chéraif I, Jannet HB, Hammami M (2005). Chemical composition of essential oils from leaves-stems, flowers and roots of *Inula graveolens* from Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8(2):249-254.

Haschek WM, Rousseaux CG (1998). Fundamentals of Toxicologic Pathology. Academic Press. San Diego.

Havsteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96:67-202.

Hodgson E (2004). A textbook of modern toxicology. Third edition. John Wiley & Sons. New Jersey.

Huo Y, Shi H, Li W, Wang M, Li X (2010). HPLC determination and NMR structural elucidation of sesquiterpene lactones in *Inula helenium*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51:942-946.

Iijima K, Kiyohara H, Tanaka M, Matsumoto T, Cyong JC, Yamada H (1995). Preventive effect of taraxasteryl acetate from *Inula britannica* subsp. japonica on experimental hepatitis in vivo. *Planta Medica* 61 (1):50-53.

Junqueira LC, Carneiro J (2005). Basic Histology: Text & Atlas. Eleventh edition. The McGraw-Hill Companies.

- Kacem I, Majdoub H, Roudesli S (2008). Fraction of soluble polysaccharides from *Inula crithmoides* by sequential extraction. *Journal of Applied Sciences* 8 (13):2442-2448.
- Kalsi PS, Goyal R, Talwar KK, Chhabra BR (1988). Epoxy alantolides: isoinunal-a new potent plant growth regulator from *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 27 (7):2079-2081.
- Kalsi S, Goyal R, Talwar KK, Chhabra BR (1989). Stereostructures of two biologically active sesquiterpene lactones from *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 28 (8):2093-2096.
- Kamboj VP (2000). Herbal medicine. *Current Science* 78 (1):35-39.
- Khan MR, Rizvi W, Khan GN, Khan RA, Shaheen S (2009). Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: protective role of *Digera muricata*. *Journal of Ethnopharmacology* 122:91-99.
- Khodzhaeva MA, Kondratenko ES (1982). The Structure of the inulin from *Inula grandis*. *Chemistry of Natural Compounds* 18 (3):364-365.
- Kim SR, Park MJ, Lee MK, Sung SH, Park EJ, Kim J, Kim SY, Oh TH, Markelonis GJ, Kim YC (2002). Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radical Biology & Medicine* 32 (7):596-604.
- Konishi T, Shimada Y, Nagao T, Okabe H, Konoshima T (2002). Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25 (10):1370-1372.
- Lee MG, Lee KT, Chi SG, Park JH (2001). Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24 (3):303-306.

Liu CH, Mishra AK, Tan RX (2006). Repellent, insecticidal and phytotoxic activities of isoalantolactone from *Inula racemosa*. *Crop Protection* 25:508-511.

Liu YP, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ, Han M (2007). Acetylbritannilactone suppresses lipopolysaccharide-induced vascular smooth muscle cell inflammatory response. *European Journal of Pharmacology* 577:28-34.

Lokhande PD, Gawai KR, Kodam KM, Kuchekar BS (2007). Antibacterial activity of isolated constituents and extract of roots of *Inula racemosa*. *Research Journal of Medicinal Plant* 1(1):7-12.

Lovkova MY, Buzuk GN, Sokolova SM, Kliment'eva NI (2001). Chemical features of medicinal plants (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 37 (3):229-237.

Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (50):33508-33516.

Mahmoud ZF, Salam NAA, Sarg TM, Bohlmann F (1981). A carotane derivative and a eudesmanolide from *Inula crithmoides*. *Phytochemistry* 20 (4):735-738.

Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C* (25):185-209.

Maoz M, Neeman I (2000). Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology* 71:479-482.

Marco JA, Sanz-Cervera JF, Manglano E (1993). Chlorinated thymol derivatives from *Inula crithmoides*. *Phytochemistry* 33 (4):875-878.

Marieb EN (2001). Human Anatomy & Physiology. Fifth edition. Benjamin Cummings. San Francisco.

- Menkovic N, Savikin K, Tasic S, Zdunic G, Stesevic D, Milosavljevic S, Vincek D (2010). Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *Journal of Ethnopharmacology*. doi:10.1016/j.jep.2010.09.008
- Metwally MA, Dawidar AM (1985). A thymol derivative from *Inula crithmoides*. *Phytochemistry* 24 (6):1377-1378.
- Nikonova LP, Gusakova SD (1972). The acid composition of *Inula grandis*. *Chemistry of Natural Compounds* 8 (1):106.
- Nikonova LP, Nikonov GK (1970). Grandulin and grandicin-new sesquiterpene lactones from *Inula grandis*. *Chemistry of Natural Compounds* 6 (1):128-129.
- Nikonova LP, Nikonov GK (1971). Sesquiterpenes of the roots of *Inula grandis*. *Chemistry of Natural Compounds* 7 (1):14-15.
- Nikonova LP, Nikonov GK (1972). Granilin – a new lactone from *Inula grandis*. *Chemistry of Natural Compounds* 8 (3):286-289.
- Nikonova LP, Nikonov GK (1975). 4',5,6-Trihydroxy-3,7-Dimethoxyflavone from *Inula grandis*. *Chemistry of Natural Compounds* 11 (1):104.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98 (3):694-702.
- O'Shea S, Lucey B, Cotter L (2009). In vitro activity of *Inula helenium* against clinical *Staphylococcus aureus* strains including MRSA. *British Journal of Biomedical Science* 66 (4):186-189.

Ozturk F, Ucar M, Ozturk IC, Vardi N, Batcioglu K (2003). Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in sprague-dawley rats. *Urology* 62 (2):353-356.

Pal HC, Sehar I, Bhushan S, Gupta BD, Saxena AK (2010). Activation of caspases and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage to induce apoptosis in leukemia HL-60 cells by *Inula racemosa*. *Toxicology in Vitro* 24:1599-1609.

Picman AK (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* 14 (3):255-281.

Pietta PG (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63 (7):1035-1042.

Plaa GL (2000). Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40:43-65.

Proença da Cunha A, Silva AP, Roque OD (2006). Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Segunda edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

Ram A, Balachandar S, Vijayananth P, Singh VP (2010). Medicinal plants useful for treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD): current status and future perspectives. *Fitoterapia*. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.005

Rates SMK (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon* 39:603-613.

Reddy BS (1999). Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *The Journal of Nutrition* 129 (7):1478-1482.

Reddy BS, Hamid R, Rao CV (1997). Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* 18 (7):1371-1374.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20 (7):933-956.

Roberfroid MB, Van Loo JAE, Gibson GR (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of Nutrition* 128 (1):11-19.

Rodriguez E, Towers GHN, Mitchell JC (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15 (11):1573-1580.

Santos CIR (2009). Avaliação do extracto aquoso de *Inula crithmoides* em ratinhos expostos a CCl₄. Tese de Mestrado, Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro.

Saric-Kundalic B, Dobes C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J (2010). Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology* 131:33-55.

Seeley RR, Stephens TD, Tate P (1995). *Anatomy & Physiology*. Third edition. Mosby-Year Book.

Song QH, Kobayashi T, Iijima K, Hong T, Cyong JC (2000). Hepatoprotective effects of *Inula britannica* on hepatic injury in mice. *Phytotherapy Research* 14 (3):180-186.

Srivastava A, Shivanandappa T (2010). Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chemistry* 118:411-417.

Srivastava S, Gupta PP, Prasad R, Dixit KS, Palit G, Ali B, Misra G, Saxena RC (1999). Evaluation of antiallergic activity (type I hypersensitivity) of *Inula racemosa* in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 43 (2):235-241.

Subramoniam A, Pushpangadan P (1999). Development of phytomedicines for liver diseases. *Indian Journal of Pharmacology* 31:166-175.

Tan RX, Tang HQ, Hu J, Shuai B (1998). Lignans and sesquiterpene lactones from *Artemisia sieversiana* and *Inula racemosa*. *Phytochemistry* 49 (1):157-161.

Topçu G, Öksüz S, Shieh HL, Cordell GA, Pezzuto JM, Bozok-Johansson C (1993). Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Inula graveolens*. *Phytochemistry* 33 (2):407-410.

Videla S, Vilaseca J, Antolín M, García-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, Casalots J, Salas A, Malagelada JR (2001). Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *The American Journal of Gastroenterology* 96 (5):1486-1493.

Williams PL, James RC, Roberts SM (2000). Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications. Second edition. John Wiley & Sons. New York.

Wollenweber E, Mayer K, Roitman JN (1991). Exudate flavonoids of *Inula viscosa*. *Phytochemistry* 30 (7):2445-2446.

Xu JY, Su YY, Cheng JS, Li SX, Liu R, Li WX, Xu GT, Li QN (2010). Protective effects of fulleranol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Carbon* 48:1388-1396.

Ye X, Feng Y, Tong Y, Ng KM, Tsao S, Lau GKK, Sze C, Zhang Y, Tang J, Shen J, Kobayashi S (2009). Hepatoprotective effects of *Coptidis rhizoma* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced acute liver hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 124:130-136.

Zeggwagh NA, Ouahidi ML, Lemhadri A, Eddouks M (2006). Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 108:223-227.

Zhao YM, Wang Y, Dong M, Zhang ML, Huo CH, Gu YC, Shi QW (2010). Two new eudesmanes from *Inula helenium*. *Chemistry of Natural Compounds* 46 (3):373-376.

Zhao YM, Zhang ML, Shi QW, Kiyota H (2006). Chemical constituents of plants from the genus *Inula*. *Chemistry & Biodiversity* 3:371-384.